

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12N 15/53, 9/02, 1/15</b>		<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/55628</b>
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Dezember 1998 (10.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT EP98-03343</b>		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, ID, JP, KR, NO, NZ, PL, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: <b>4. Juni 1998 (04.06.98)</b>			
(30) Prioritätsdaten: 197 24 039.9      6. Juni 1997 (06.06.97) <b>DE</b>		<b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): CONSOR- TIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE GMBH [DE/DE]; Zielstattstrasse 20, D-81379 München (DE).			
(72) Erfinder; und			
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PFALLER, Rupert [DE/DE]; Nibelungenstrasse 6, D-80639 München (DE). WICH, Günter [DE/DE]; Uttingerstrasse 14, D-81379 München (DE).			
(74) Anwälte: POTTEN, Hoiger usw.; Wacker-Chemie GmbH, Zentralbereich PML, Hanns-Seidel-Platz 4, D-81737 München (DE).			
(54) Title: DNA SEQUENCES, EXPRESSION OF SAID DNA SEQUENCES, THERMOPILE LACCASES CODED BY SAID DNA SEQUENCES AND THE USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: DNS-SEQUENZEN, EXPRESSION DIESER DNS-SEQUENZEN, DURCH DIE DNS-SEQUENZEN KODIERTE THERMOPHILE LACCASEN SOWIE DEREN VERWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to DNA sequences which code for proteins with laccase activity, comprising one of the DNA sequences (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2). The invention also relates to the expression of these DNA sequences, thermopile laccases coded by said DNA sequences and their use for delignifying cellulose, depolymerizing high-molecular aggregates, de-inking waste paper, polymerising aromatic compounds in waste liquids, especially waste liquids from cellulose bleaching, oxidising colorants and activating colorants to produce pigments, and their use in organic synthesis in coupling reactions of aromatic compounds or the oxidation of aromatic side chains.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft DNS-Sequenzen, die für Proteine mit Laccase-Aktivität kodieren und eine der DNS-Sequenzen (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2) umfassen. Die Erfindung betrifft ferner die Expression dieser DNS-Sequenzen, die durch die DNS-Sequenzen kodierte thermophilen Laccasen sowie deren Verwendung für die Delignifizierung von Zellstoff, die Depolymerisierung hochmolekularer Aggregate, das Deinking von Altpapier, die Polymerisierung aromatischer Verbindungen in Abwässern, vor allem von ligninhaltigen Abwässern aus der Zellstoffbleiche, die Oxidation von Farbstoffen, bzw. die Aktivierung von Farbstoffen zur Pigmentbildung, die Verwendung in der organischen Synthese bei Kopplungsreaktionen von aromatischen Verbindungen oder der Oxidation aromatischer Seitenketten.</p>			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbogen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

DNS-Sequenzen, Expression dieser DNS-Sequenzen, durch die DNS-Sequenzen kodierte thermophile Laccasen sowie deren Verwendung

- 5 Die Erfindung betrifft DNS-Sequenzen, die für Proteine mit Laccase-Aktivität kodieren, die Expression dieser DNS-Sequenzen, die durch die DNS-Sequenzen kodierten thermophilen Laccasen sowie deren Verwendung.
- 10 Eine Enzymklasse, die für industrielle Anwendungen von großem Interesse ist, ist die Enzymklasse der Laccasen (p-Hydroxyphe-  
noloxidase, EC 1.10.3.2.). Laccasen gehören zur Proteinfamilie der sogenannten "blauen Kupferproteine" und enthalten in der Regel vier Kupferionen, die in drei, Typ 1 bis Typ 3 bezeich-  
15 neten Kupferzentren angeordnet sind. Laccasen zeichnen sich dadurch aus, daß es sich allgemein um sekretierte Proteine handelt und daß sie einen Glykosylierungsanteil von 10 bis 45 % des Molekulargewichts enthalten können. Laccasen besitzen eine sehr breite Substratspezifität für aromatische Verbindun-  
20 gen, die sie oxidieren. Die bei dieser Oxidation erzeugten Elektronen werden verwendet um Sauerstoff zu reduzieren. Dabei entsteht Wasser. Die Funktion der Laccasen, die in Weißfäulepilzen vorkommen, besteht unter anderem im Ligninabbau. Daher stammt auch das Interesse, Laccasen bei der Papierherstellung  
25 zur Delignifizierung von Zellstoff einzusetzen.

Neben der Depolymerisierung von makromolekularen Verbindungen wie Lignin können Laccasen auch die Polymerisierung vor allem aromatischer Verbindungen katalysieren. Als Beispiel hierfür  
30 dient die Ligninbiosynthese in Pflanzen, bei der in Pflanzen vorkommende Laccasen beteiligt sind. Technische Anwendungsmöglichkeiten für Laccasen ergeben sich daher auch allgemein bei Polymerisierungsreaktionen aller Art, z.B. bei der Abwasserbe-  
handlung. Die Verwendung von Laccasen ist auch in der organi-  
35 schen chemischen Synthese bekannt, z.B. bei Kopplungsreaktionen oder der Seitenkettenoxidation von Aromaten. Für viele dieser potentiellen Anwendungen ist es jedoch von Nachteil, daß die meisten bekannten Laccasen mesophil sind, d. h. sie

besitzen ein niedriges Temperaturoptimum und eine begrenzte Temperaturstabilität.

Voraussetzung für die technische Anwendung von Laccaseenzymen ist, daß sie kostengünstig hergestellt werden können. Dies ist im allgemeinen nur durch Verwendung rekombinant hergestellter Enzyme möglich. Verschiedene prokaryontische und eukaryontische Expressionssysteme stehen für die Proteinproduktion zur Verfügung. Beispiele prokaryontischer Expressionssysteme sind Escherichia coli und Bacillus subtilis. Eukaryontische Expressionssysteme mit breiter Anwendung sind Zellkultursysteme sowohl von Säugerzellen wie auch Insektenzellen sowie eukaryontische Mikroorganismen wie Hefen oder filamentöse Pilze.

In WO96/00290 werden fünf Laccasegene aus dem filamentösen Pilz der Unterklasse der Basidiomyceten, Polyporus pinsitus, beschrieben. Eines dieser Laccasegene (LCC1) wurde als rekombinantes Protein hergestellt. Die thermophilen Eigenschaften dieses Enzyms wurden nicht weiter untersucht, die beschriebene Verwendung der LCC1 Laccase für Zwecke der Haarfärbung läßt darauf schließen, daß dieses Enzym einen mesophilen Charakter hat.

Die Herstellung einer rekombinanten Laccase mit thermophilen Eigenschaften aus dem filamentösen Pilz der Unterklasse der Deuteromyceten, Scytalidium thermophilum wird in WO 95/33837 beschrieben. Von diesem Enzym ist nicht bekannt, ob es sich für die Zellstoffbleiche eignet.

Es wurde noch kein Verfahren für die Herstellung als rekombinantes Protein einer thermophilen Laccase aus einem filamentösen Pilz aus der Unterklasse der Basidiomyceten beschrieben.

In dem CA: AN 96-203142 werden verschiedene Charakteristika einer thermophilen Laccase offenbart. DNS oder Proteinsequenz dieses Proteins sind nicht genannt.

Die Erfindung betrifft eine DNS-Sequenz, die für ein Protein mit Laccaseaktivität kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie die DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 ab Position 76 bis einschließlich Position 1572 oder SEQ ID NO:2 ab Position 76 bis einschließlich Position 1572 oder eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 80 % zu den genannten DNS-Sequenzen umfasst.

10 SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 geben von Position 1 bis Position 75 die DNS Sequenz kodierend für die Signalsequenz zur Sekretion des Proteins wieder. Diese Signalsequenz läßt sich gegen beliebige andere Signalsequenzen zur Proteinsekretion austauschen.

15 Die erfindungsgemäße DNS-Sequenz läßt sich beispielsweise durch Klonierung aus dem Basidiomycetenstamm *Trametes versicolor* TV-1 (hinterlegt bei der DSMZ Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig unter der Nummer DSM 11523) erhalten. Dazu wird mittels an sich  
20 bekannter Methoden eine Genbank von *Trametes versicolor* TV-1 erstellt. Es kann sich dabei um eine cDNS- oder um eine genomische Genbank handeln.

Zur Isolierung der erfindungsgemäßen DNS-Sequenz in der Genbank werden DNS-Sonden verwendet, die laccasespezifische DNS-Sequenzen enthalten. Solche DNS-Sonden lassen sich beispielsweise mittels PCR-Reaktion unter Verwendung von DNS-Primern aus genomischer DNS von *Trametes versicolor* TV-1 gewinnen.

30 Als Primer werden degenerierte DNS Abschnitte einer Länge von vorzugsweise 14 bis 27 bp verwendet, deren Sequenz durch Sequenzvergleich bekannter Laccasegene festgelegt wird.

Die als Primer geeigneten DNS-Abschnitte erhält man vorzugsweise durch Oligonukleotidsynthese der festgelegten DNS-Abschnitte.

Die Isolation eines erfindungsgemäßen Laccasegens kann beispielsweise wie in den Beispielen 1 bis 5 beschrieben erfolgen.

5 Ein beispielsweise derart isoliertes Laccasegen läßt sich mittels der Fachmann bekannter Techniken wie beispielsweise der site directed Mutagenese an jeweils gewünschter Position der Sequenz modifizieren. Daher ist auch eine DNS-Sequenz kodierend für ein Protein mit Laccaseaktivität umfassend eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 80 % zu der DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 ab Position 76 bis einschließlich Position 1572 oder SEQ ID NO:2 ab Position 76 bis einschließlich Position 1572 von der Erfindung umfasst.

15 Zur Expression der erfindungsgemäßen DNS wird diese in an sich bekannter Art und Weise in einem Expressionsvektor kloniert, dieser das Laccasegen enthaltende Expressionsvektor in einen Mikroorganismus eingebracht und in dem Mikroorganismus exprimiert.

20 Bei dem Expressionsvektor kann es sich um ein DNS-Konstrukt handeln, das in das Genom des Wirtsorganismus integriert und zusammen mit diesem repliziert wird. Alternativ kann es sich bei dem Expressionsvektor um ein autonom replizierendes DNS-Konstrukt handeln, das nicht in das Wirtsgenom integriert, wie 25 z.B. ein Plasmid, ein artifizielles Chromosom oder ein vergleichbares extrachromosomales genetisches Element.

Ein geeigneter Expressionsvektor sollte vorzugsweise folgende 30 genetische Elemente enthalten:

Einen Promotor, der die Expression des Laccasegens in dem Wirtsorganismus vermittelt. Es sollte sich dabei vorzugsweise um einen starken Promotor handeln, damit eine hohe Expressionsleistung gewährleistet werden kann. Der Promotor ist vorzugsweise funktionell mit dem 5'-Ende des Laccasegens verknüpft.

Vorzugsweise geeignete Promotoren sind ausgewählt aus der Gruppe tac-Promotor, Subtilisin-Promotor, GAL-Promotor, TAKA-Amylase-Promotor, Polyhedrin-Promotor, Glucoamylase-Promotor, gapDH-Promotor und Alkoholoxidase Promotor.

5

Vorzugsweise eignet sich der tac-Promotor für die Expression in *E. coli*, der Subtilisin-Promotor für die Expression in *Bacillus*, der GAL-Promotor für die Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, der TAKA-Amylase-Promotor für die Expression in *Aspergillus niger*, der Polyhedrin-Promotor für die Expression in Baculovirus-infizierten Insektenzellen, der Glucoamylase-Promotor aus *Aspergillus niger* oder der Alkoholoxidase-Promotor aus der Hefe *Pichia pastoris*.

15 Insbesondere eignen sich der Glucoamylase-Promotor aus *Aspergillus niger* oder der Alkoholoxidase-Promotor aus der Hefe *Pichia pastoris* für die Expression der erfindungsgemäßen thermophilen Laccasen.

20 Ferner sollten vorzugsweise für den Wirtsorganismus passende Signale für die Transkriptionstermination und in Eukaryonten zusätzlich Signale für die Polyadenylierung in dem Expressionsvektor enthalten und funktionell mit dem 3'-Ende des Laccasegens verknüpft sein.

25

Vorzugsweise soll das exprimierte Protein durch den Wirtsorganismus in das Anzuchtmedium sekretiert werden. Die Sekretion aus dem Wirtsorganismus wird durch eine N-terminale Signalsequenz vermittelt. Bei der Signalsequenz handelt es sich um die natürliche im Laccasegen enthaltene Signalsequenz oder um eine heterologe Signalsequenz, deren kodierende DNS im Expressionsvektor funktionell mit dem 5'-Ende des Laccasegens verknüpft ist.

35 Bevorzugt sind die Signalsequenzen folgender sekretierter Proteine: alpha-Cyclodextrin-Glucosyltransferase aus *Klebsiella oxytoca*, Subtilisin aus *Bacillus subtilis*, alpha-Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*, saure Phosphatase aus *Pichia*

*pastoris*, alpha-Amylase aus *Aspergillus niger*, Glucoamylase aus *Aspergillus niger* bzw. aus *Aspergillus awamori* oder die natürlich im Laccasegen enthaltene Signalsequenz.

- 5 Insbesondere eignet sich die natürlich im Laccasegen enthaltene Signalsequenz sowie folgende heterologe Signalsequenzen: Die Signalsequenz der Glucoamylase aus *Aspergillus niger*, bzw. aus *Aspergillus awamori*, die Signalsequenz des alpha-Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie der sauren Phosphatase aus  
10 *Pichia pastoris*.

- Die Sekretion der Laccase kann auch durch die Expression eines Fusionsproteins erreicht werden, bei dem im Expressionsvektor ein Gen für ein sekretiertes Protein, bzw. für ein sekretiertes  
15 Fragment dieses Proteins, funktionell mit dem Laccasegen verknüpft ist. Insbesondere bevorzugt ist hier die Expression eines Fusionsproteins zwischen einem N-terminalen Fragment der Glucoamylase aus *Aspergillus niger* und der thermophilen Laccase.

- 20 Die Verknüpfungsstelle zwischen der Glucoamylase und der Laccase ist dabei vorzugsweise so gewählt, daß die Aminosäuresequenz dieser Verknüpfungsstelle als Erkennungsstelle für eine prozessierende Peptidase im Sekretionsapparat der Wirtszelle dient, wobei das exprimierte Fusionsprotein *in vivo* gespalten  
25 und die Laccase freigesetzt wird.

- Des weiteren enthält der Expressionsvektor vorzugsweise das Gen für einen Selektionsmarker. Die durch das Gen kodierten  
30 Selektionsmarker können dem Wirtsorganismus entweder Resistenz gegen ein Antibiotikum verleihen oder einen Defekt im Wirtsorganismus komplementieren.

- Bevorzugte Selektionsmarker sind Gene, die Resistenz gegen Antibiotika wie Ampicillin, Kanamycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Hygromycin, Zeocin oder Bialaphos verleihen. Als Selektionsmarker für die Komplementation von Wachstumsdefekten sind  
35



Gene wie *amdS*, *pyrG*, *trpC*, *His4*, *niaD*, *argB*, oder *hygB* bevorzugt.

Insbesondere eignen sich als Selektionsmarker das *amdS* und das  
5 *pyrG* Gen sowie das *His4* Gen und das Resistenzgen für das Antibiotikum Zeocin.

Das Selektionsmarkergen kann dabei zusammen mit dem Laccasegen in einem DNS-Molekül enthalten sein oder beide Gene können getrennt in verschiedenen DNS-Molekülen enthalten sein. Im letz-  
10 teren Fall wird der Wirtsorganismus mit beiden DNS-Molekülen gemeinsam cotransformiert.

Die Erfindung betrifft somit auch Expressionsvektoren die er-  
15 findungsgemäße DNS-Sequenzen enthalten.

Als Mikroorganismen zur Expression der erfindungsgemäßen Expressionsvektoren eignen sich vorzugsweise solche bakteriellen Ursprungs wie *E. coli* oder *Bacillus subtilis*, Mikroorganismen  
20 eukaryontischen Ursprungs wie Hefen der Gattung *Saccharomyces* oder *Pichia*, oder aber filamentöse Pilze der Gattung *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Neurospora* oder *Schizophyllum* oder eukaryontische Zellkulturen wie z. B. mit Baculoviren infizierte Insektenzellen.

25 Insbesondere eignen sich filamentöse Pilze der Gattung *Aspergillus* wie *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori* oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*.

30 Die Proteine, die durch die erfindungsgemäße DNS kodiert werden haben folgende biochemischen Eigenschaften:

Die Proteine besitzen die enzymatische Aktivität von Laccasen. Das pH-Optimum der Enzymaktivität liegt im sauren Bereich und  
35 ist maximal bei pH 2.0, mit halbmaximaler Enzymaktivität bei pH 4.0.

Die Enzymstabilität bei 45°C und einem pH von 4.5 bis 6.0 beträgt bis zu einer Zeitdauer von 2 h 100 %.

Die Enzymstabilität bei 45°C und einem pH von 3.0 beträgt bis zu einer Zeitdauer von 1 h 50 %.

Das Temperaturoptimum beträgt bei einem pH von 4.5 70°C.

5 Von 65 - 75°C beträgt die Enzymaktivität noch 80 % der maximalen Aktivität.

Von 50 - 80°C beträgt die Enzymaktivität noch 50 % der maximalen Aktivität.

Die Enzymstabilität bei einem pH von 4.5 und Temperaturen bis zu 55°C beträgt bis zu einer Zeitdauer von 2 h 90 %.

10 Die Enzymstabilität bei einem pH von 4.5 und einer Temperatur von 65°C beträgt bis zu einer Zeitdauer von 1 h 50 %.

Die erfindungsgemäßen Proteine umfassen die Proteinsequenz SEQ ID NO:3.

15 Das erfindungsgemäße Protein wird vorzugsweise durch Expression erfindungsgemäßer DNS-Sequenzen in einem vorstehend genannten Mikroorganismus hergestellt.

20 Vorzugsweise wird die DNS unter Verwendung eines der vorstehend genannten Expressionsvektoren im Mikroorganismus exprimiert.

25 Die Erfindung betrifft somit auch Mikroorganismen, die erfindungsgemäße DNS-Sequenzen oder erfindungsgemäße Expressionsvektoren enthalten.

Besonders bevorzugt werden Kombinationen von Mikroorganismen und Expressionssystemen verwendet, die auch die Sekretion des Proteins aus dem Mikroorganismus ermöglichen. Beispiele für solche bevorzugten Kombinationen sind:

30 Die Verwendung des Glucoamylase Promoters zur Expression der erfindungsgemäßen DNS-Sequenzen in *Aspergillus niger* oder *Aspergillus awamori*. Als Sekretionssignal in diesem Expressionssystem dient vorzugsweise die Signalsequenz der thermophilen Laccase selbst oder der Glucoamylaseanteil des Glucoamylase-Laccase-Fusionsproteins.

Die Verwendung des Alkoholoxidasepromotors zur Expression der erfindungsgemäßen DNS Sequenzen in *Pichia pastoris*. Als Sekretionssignal in diesem Expressionssystem dient vorzugsweise die Signalsequenz der thermophilen Laccase selbst oder die Signalsequenz des alpha-Faktors aus *Saccharomyces cerevisiae* oder aber die Signalsequenz der sauren Phosphatase aus *Pichia pastoris*.

Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich für alle Anwendungen die für Laccasen bekannt sind. Insbesondere eignen sie sich für die Delignifizierung von Zellstoff bzw. die Depolymerisierung von hochmolekularen Aggregaten. Weitere Verwendung finden Laccasen beim Deinking von Altpapier, der Polymerisierung von aromatischen Verbindungen bei der Abwasserreinigung, hier vor allem von ligninhaltigen Abwässern aus der Zellstoffbleiche oder in einer erweiterten Anwendung bei der Entgiftung von verseuchten Böden. Weitere Einsatzgebiete betreffen die Oxidation von Farbstoffen bzw. die Aktivierung von Farbstoffen durch Reaktion mit Vorstufenkomponenten unter Pigmentbildung. Einsatzgebiete in der organischen Synthese umfassen Kopplungsreaktionen von aromatischen Verbindungen oder die Substituentenoxidation von Aromaten, hier z. B. die Oxidation von Benzylalkoholen zu den entsprechenden Aldehyden unter Vermeidung der weiteren Oxidation zur Carbonsäure. Bei den o. g. Verwendungen kann die Laccase für sich allein genommen in die entsprechenden Reaktionen eingesetzt werden oder aber auch durch Kombination mit einem reaktionsverstärkenden Mediator. Beispiele für solche Mediatoren sind ABTS oder N-Hydroxybenzotriazol.

Die Erfindung betrifft somit auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins für die Delignifizierung von Zellstoff, die Depolymerisierung hochmolekularer Aggregate, das Deinking von Altpapier, die Polymerisierung aromatischer Verbindungen in Abwässern, vor allem von ligninhaltigen Abwässern aus der Zellstoffbleiche, die Oxidation von Farbstoffen, bzw. die Aktivierung von Farbstoffen zur Pigmentbildung, die Verwendung

in der organischen Synthese bei Kopplungsreaktionen von aromatischen Verbindungen oder der Oxidation aromatischer Seitenketten.

- 5 Die o. g. Verwendungen können durch Einsatz der erfindungsgemäßen Laccaseproteine für sich allein genommen oder aber durch Kombination mit einem reaktionsverstärkenden Mediator ausgeführt werden.

10 Fig. 1 zeigt die Struktur des DNS-Vektors pANlac1S.

Fig. 2 zeigt die Struktur des DNS-Vektors pANlac2S.

Fig. 3 zeigt die Struktur des DNS-Vektors pL512.

15

Fig. 4 zeigt die Struktur des DNS-Vektors pL532.

Fig. 5 zeigt die Abhängigkeit der Aktivität einer erfindungsgemäßen Laccase vom pH.

20

Fig. 6 zeigt die pH-Stabilität der erfindungsgemäßen Laccase.

Fig. 7 zeigt die Abhängigkeit der Aktivität einer erfindungsgemäßen Laccase von der Temperatur.

25

Fig. 8 zeigt die Temperaturstabilität der erfindungsgemäßen Laccase.

Die folgenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der  
30 Erfindung. Die in den Beispielen verwendeten Standardmethoden zur Behandlung von DNS oder RNS, wie die Behandlung mit Restriktionsendonukleasen, DNS Polymerasen, Reverser Transkriptase etc. sowie die Standardverfahren wie Transformation von Bakterien, Southern und Northern Analyse, DNS-Sequenzierung,  
35 radioaktive Markierung, Screening und PCR-Technologie wurden, wenn nicht anders angegeben, durchgeführt wie vom Hersteller der verwendeten Kits empfohlen oder, wenn keine

Herstellervoranleitung vorhanden war, entsprechend dem aus den Standardlehrbüchern bekannten Stand der Technik.

#### 1. Beispiel:

##### 5 Herstellung einer cDNS-Bank aus *Trametes versicolor* TV-1

Es wurde der Stamm *Trametes versicolor* TV-1 verwendet. Mycel von *Trametes versicolor* wurde zuerst durch Anzucht für 7 Tage bei 28°C auf Malzagarplatten (3 % Malz Extrakt, 0,3 % Pepton aus Sojabohnenmehl, 1,5 % Agar-Agar, pH 5,0) gewonnen. Von den  
10 Malzagarplatten wurden drei Stücke ausgestanzt und damit 100 ml steriles Malzextrakt Medium (3 % Malz Extrakt, 0,3 % Pepton aus Sojabohnenmehl, pH 5,0) in 500 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 100 rpm für 7 Tage  
15 bei 28°C inkubiert. Die auf diese Weise hergestellte Mycelsuspension wurde über eine Porzellannutsche abgesaugt, mit 0,9 % Saline gewaschen und das Mycel in flüssigem Stickstoff gefroren und mit Mörser und Pistill zerkleinert. RNS wurde mit einem RNeasy-Kit (Qiagen) isoliert. Die Ausbeute aus 200 mg Mycel betrug 100 µg RNS.  
20

600 µg RNS wurden verwendet, um mRNA zu isolieren. Dies erfolgte durch Chromatographie über Oligo-dT Sepharose mRNA-Isolierungskit, Pharmacia). Die Ausbeute an mRNA betrug 26 µg.  
25 7,25 µg der isolierten mRNA wurden zur Synthese von cDNA verwendet. Dazu wurde ein cDNA-Synthesekit der Fa. Stratagene verwendet. Die cDNA wurde nach Auftrennung durch Agarose Gelelektrophorese fraktioniert in einen Größenbereich von 0,8 - 2,1 kb und einen Größenbereich von 2,1 - 5 kb. Die cDNA beider  
30 Fraktionen wurde aus der Agarose isoliert (Qiagen Gelextraktionskit) und zur Herstellung der cDNA-Bank verwendet. Die cDNA-Bank wurde in Lambda-Phagen hergestellt (Stratagene, ZAP Express Klonierungssystem). Von der 0,8 - 2,1 kb Fraktion wurden  $4 \times 10^5$  Phagen/µg Vektor-DNA erhalten. Von der 2,1 - 5 kb  
35 Fraktion wurden  $1 \times 10^5$  Phagen/µg Vektor-DNA erhalten. Die erhaltenen Phagen wurden durch Infektion des *E. coli* Stammes XL-1 Blue MRF' (Stratagene) amplifiziert.

## 2. Beispiel

Herstellung einer chromosomalen Genbank von *Trametes versicolor*

5

Mycel von *Trametes versicolor* TV-1 wurde hergestellt wie im 1. Beispiel beschrieben. Das Mycel wurde über eine Porzellannutsche abgesaugt und mit 0,9% Saline gewaschen, anschließend in flüssigem Stickstoff gefroren, mit Mörser und Pistill zerkleinert und in 1g Portionen aufgeteilt. Je 1 g des zerriebenen Mycels wurden in einem sterilen Probengefäß aufgenommen und sofort mit 5 ml Extraktionslösung (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,1 M EDTA, 0,15 M NaCl, 0,6 mg/ml Proteinase K) und 0,5 ml einer 10 % (w/v) Natriumlaurylsarcosinlösung versetzt. Nach 15 Inkubation bei 50°C für mindestens 2 h wurde das Gemisch mit 0,65 ml 5 M NaCl und 0,7 ml einer 10 % (w/v) CTAB-Lösung in 0,7 M NaCl versetzt und 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml eines Chloroform-Isomylalkoholgemisches (24:1) wurde der Ansatz geschüttelt und die beiden Phasen durch Zentrifugation 20 getrennt. Die wässrige Phase wurde entfernt und chromosomale DNS durch Zugabe von 0,6 Volumenanteilen Isopropanol gefällt. Die gefällte DNS wurde anschließend über eine Säule (Qiagen Genomic Tip) gereinigt.

Auf diese Weise konnten aus 16 g Mycel 0,5 mg chromosomale DNS 25 isoliert werden.

Zur Herstellung der chromosomalen Genbank wurden 90 µg chromosomale DNS von *Trametes versicolor* TV-1 vollständig mit Eco RI geschnitten und durch Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. 30 Die chromosomalen DNS-Fragmente wurden im Größenbereich von 2 - 4 kb und von 4 kb - 10 kb isoliert und jeweils in Lambda-Phagen kloniert (Stratagene, ZAP Express Klonierungssystem). Von der 2 - 4 kb DNS-Fraktion wurden  $1 \times 10^5$  Phagen/µg Vektor-DNS und von der 4 - 10 kb DNS-Fraktion wurden  $5.4 \times 10^4$  Pha- 35 gen/µg Vektor-DNS erhalten. Die Phagen wurden durch Infektion des *E. coli* Stammes XL-1 Blue MRF' amplifiziert.

## 3. Beispiel

Herstellung einer Laccase-spezifischen DNS-Sonde aus genomischer DNS von *Trametes versicolor*

5 Eine DNS-Sonde zur Isolierung von Laccasegenen wurde durch PCR-Amplifikation aus *T. versicolor* genomischer DNS mit degenerierten Primern erzeugt. Die degenerierten Primer wurden anhand eines Sequenzvergleichs bekannter Laccasegene konstruiert. Es wurden die Aminosäuresequenzen der in der EMBL Gen-

10 datenbank enthaltenen Laccasegene von *Neurospora crassa*, *Coriolus hirsutus*, *Phlebia radiata*, *Agaricus bisporus* und eines nicht näher charakterisierten filamentösen Pilzes aus der Unterklasse der Basidiomyceten verglichen. Durch den Sequenzvergleich konnten vier Peptide mit einer Länge von 5 bis 7 Aminosäuren identifiziert werden, die in allen Laccasen vollständig konserviert waren. Unter Berücksichtigung degenerierter Codons wurden diese Peptide in DNA zurück übersetzt, um degenerierte Primer herzustellen. Die Primer hatten die folgenden Sequenzen:

20 A: 5'-TGGCAYGGNTTYTTYCA-3' (SEQ ID NO:4)  
B: 5'-TCDATRTGRCARTG-3' (SEQ ID NO:5)  
C: 5'-ATTCAGGGATCCTGGTAYCAYWSNCAY-3' (SEQ ID NO:6)  
D: 5'-ATACGAGGATCCRTGNC CRTGNARRTG-3' (SEQ ID NO:7)

25 Primer C und D enthielten am 5'-Ende eine Bam HI Schnittstelle (unterstrichen) und daran angeschlossen jeweils die entsprechende degenerierte Laccasesequenz.

30 Genomische DNS von *T. versicolor* wurde aus dem Mycel einer Schüttelkolbenkultur isoliert wie im 2. Beispiel beschrieben. PCR-Amplifikationen wurden nach dem für den Fachmann geläufigen Stand der Technik durchgeführt. In einer ersten PCR-Reaktion wurden 200 ng chromosomaler *T. versicolor* DNS in einer

35 100 µl PCR Reaktion eingesetzt, die darüberhinaus 1,25 U Taq Polymerase, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 mM der vier dNTPs und jeweils 100 pmol der Primer A und B enthielt. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten PCR-

Produkts waren: 5 min bei 94°C, gefolgt von 7 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 40°C und 2,5 min bei 60°C sowie 30 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 50°C und 2,5 min bei 72°C. 1 µl der ersten PCR-Reaktion wurden in einer zweiten PCR-Reaktion eingesetzt, die darüberhinaus 1,25 U Taq Polymerase, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 mM der vier dNTPs und jeweils 100 pmol der Primer C und D enthielt. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten PCR-Produkts waren: 5 min bei 94°C, gefolgt von 7 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 40°C und 2,5 min bei 60°C sowie 30 Zyklen von 0,5 min bei 94°C, 1 min bei 50°C und 2,5 min bei 72°C. Es wurde ein PCR-Produkt von ca. 1,1 kb erhalten. Das PCR-Produkt wurde durch Agarose Gelelektrophorese gereinigt, mit dem Restriktionsenzym Bam HI geschnitten und in einen mit Bam HI geschnittenen pUC18 Vektor kloniert und E. coli transformiert. Aus der Anzucht transformierter E. coli wurde das Plasmid isoliert. DNS-Sequenzanalyse vom 5'- und 3'-Ende bestätigte, daß es sich bei dem klonierten DNS-Fragment um das Fragment eines Laccasegens handelte.

Zur Vorbereitung der DNS-Sonde für das Screening von Laccasegenen wurde das Laccase-spezifische PCR-Fragment durch Behandlung mit Bam HI ausgeschnitten, über Agarose-Elektrophorese isoliert und mit α-[<sup>32</sup>P]-dATP radioaktiv markiert ("Random Priming" Kit, Boehringer Mannheim). Freie Radioaktivität wurde durch Chromatographie über Sephadex G25 (Pharmacia) abgetrennt. Die spezifische Aktivität der radioaktiv markierten DNS-Sonde betrug  $1 \times 10^7$  cpm/µg DNS.

#### 4. Beispiel

##### Isolierung des cDNS-Gens einer Laccase aus Trametes versicolor TV-1

Es wurde die im 1. Beispiel beschriebene cDNS Genbank von Trametes versicolor TV-1 verwendet. Das Screening nach Laccase cDNS-Genen wurde nach dem Stand der Technik durchgeführt. In



einer ersten Screeningrunde wurden Zellen von *E. coli* XL-1 Blue MRF' auf 10 Petrischalen zuerst kultiviert und dann mit 50000 Phagen der cDNS-Bank (0,8 - 2,1 kb Fraktion, siehe 1. Beispiel) pro Petrischale infiziert. Nach Inkubation bei 37°C  
5 über Nacht wurden die neu gebildeten Phagen auf Nylonfilter (Stratagene) transferiert. Die Filter wurden dann entsprechend den Empfehlungen des Herstellers mit der radioaktiv markierten Laccase-spezifischen Sonde (siehe 3. Beispiel) hybridisiert. Die Hybridisierungstemperatur betrug 45°C in einem Hybridisie-  
10 rungspuffer mit 50% Formamidgehalt. Positive Klone wurden gepickt und durch Wiederholung des Screeningverfahrens gereinigt. Nach drei Runden der Vereinzelung wurden bei dem Screening 20 stark hybridisierende Phagenklone isoliert, die nach einer Vorschrift des Herstellers (Stratagene) durch "in vivo  
15 excision" in den pBK CMV Vektor (Stratagene) umkloniert wurden. Analyse der Klone durch Verdau mit Restriktionsendonucleasen und DNS-Sequenzierung ergab, daß zwei Laccasegene isoliert worden waren, die auf DNS-Ebene fast identisch waren. Die vollständige DNS-Sequenzierung der beiden Klone ergab, daß  
20 es sich um Allele eines Laccasegens handelte, deren Aminosäuresequenz identisch war. Die beiden Laccase cDNS-Gene erhielten die Bezeichnung Lac5.5 und Lac5.6. Entsprechend wurden die Plasmide mit den beiden Laccase cDNS-Genen pLac5.5 und pLac5.6 bezeichnet.

25

#### 5. Beispiel

##### Isolierung des chromosomalen Gens einer Laccase aus *Trametes versicolor* TV-1

30

Das Screening nach chromosomalen Laccasegenen in der im 2. Beispiel beschriebenen chromosomalen Genbank von *Trametes versicolor* TV-1 (2 - 10 kb Fraktion, siehe 2. Beispiel) erfolgte analog dem im 4. Beispiel beschriebenen Screening nach cDNS-  
35 Klonen. Es wurde wiederum die im 3. Beispiel beschriebene, radioaktiv markierte Laccase-spezifische Sonde verwendet. Die Hybridisierungstemperatur betrug 45°C in einem Hybridisierungspuffer mit 50% Formamidgehalt. Bei dem Screening wurden

drei stark hybridisierende Phagenklone isoliert, die nach einer Vorschrift des Herstellers (Stratagene) durch "in vivo excision" in den pBK CMV Vektor (Stratagene) umkloniert wurden. Analyse mit Restriktionsendonucleasen führte zu dem  
5 Schluß, daß alle drei Klone identisch waren und eine Länge von ca. 7 kb hatten. Analyse durch DNS-Sequenzierung ergab, daß alle drei Klone dem chromosomalen Gen der Laccase Lac5.6 entsprachen. Es wurden der codierende Bereich eines Klon und jeweils ca. 1 kb flankierende Sequenz im 5'- und im 3'-Bereich  
10 sequenziert. (SEQ ID NO: 8).

#### 6. Beispiel

##### Herstellung von DNS-Konstrukten für die Expression von Laccase Lac5.5 in Aspergillus

15 cDNS der *Trametes versicolor* Laccase Lac5.5 wurde mit Expressionssignalen funktionell verknüpft, die spezifisch für filamentöse Pilze aus der Familie *Aspergillus* sind. Folgende Genexpressionselemente aus *Aspergillus* wurden verwendet:

20 a) Der Promotor für das Glucoamylase Gen (glaA) aus *Aspergillus niger* (J.C. Verdoes, P.J. Punt, J.M. Schrickx, H.W. van Verseveld, A.H. Stouthamer und C.A.M.J.J. van den Hondel Transgenic Research 2 (1993), 84 - 92).

25 b) Der glaA Promotor gefolgt von einem DNS-Fragment, das für die Signalsequenz und ein Bruchstück der reifen Glucoamylase kodiert. Daran angeknüpft wurde eine DNS-Sequenz, die für die Spaltstelle der KEX2-Protease kodiert (M.P. Broekhuijsen, I.E. Mattern, R. Contreras, J. R. Kinghorn, C.A.M.J.J. van den Hondel (1993), J. Biotechnol. 31, 135-145).

30 c) der Transkriptionsterminator des trpC Gens aus *Aspergillus nidulans* (E. J. Mullaney, J. E. Hamer, M. M. Yelton und W. E. Timberlake (1985), Mol. Gen. Genet. 199, 37-45).

Für die funktionelle Verknüpfung der Lac5.5 cDNS mit den *Aspergillus*-Expressionssignalen war es jedoch zuerst notwendig,  
35 die 5'- und 3'-Bereiche des Lac5.5 cDNS Gens zu modifizieren.

##### A: Verknüpfung der Laccase Lac5.5 cDNS mit dem glaA Promotor:

Für die weitere Bearbeitung wurde das Lac5.5 cDNS Gen in den Vektor pUC19 umklontiert. Dazu wurde das Lac5.5 cDNS Gen als 1,9 kb Eco RI-Xba I Fragment aus dem im 1. Beispiel erhaltenen pBK CMV Vektor isoliert und in den mit Eco RI und Xba I vorge-

5 schnittenen pUC19 Vektor subklontiert. Das dabei entstandene 4.6 kb Plasmid wurde pLac5 genannt.

Zur Modifizierung des Start-ATG Kodons des Lac5.5 cDNS Gens wurden die Primer E und F verwendet.

10

Primer E: 5'-~~CGG~~GAATTCATGACTGGGCTGCCTCTCCTTCCTTCCTTC-3' (SEQ ID NO:9)

Primer F: 5'-GAGAGGCCCGGGAGCCTGG-3' (SEQ ID NO:10)

15 Unterstrichen in Primer E ist eine Bsp HI Schnittstelle, in Primer F eine Sma I, bzw. Xma I Schnittstelle.

Zur Modifizierung des 3'-Bereiches des Lac5.5 cDNS Gens wurden die Primer G und H verwendet.

20

Primer G: 5'-GCTGAATTCGAAGACATCCCCGACACCAAGG-3' (SEQ ID NO:11)

Primer H: 5'-TGCTCTAGAAAGCTTAAATTCACTGGTCGTCAGCGTCGAGGG-3' (SEQ ID NO:12)

25 Unterstrichen in Primer G ist eine Ebs I Schnittstelle, in Primer H eine Afl II Schnittstelle.

Mit den Primern E und F wurde im 5'-Bereich des Lac5.5 cDNS Gens ein 188 bp großes Fragment durch eine PCR-Reaktion amplifi-

30 fiziert. Mit den Primern G und H wurde im 3'-Bereich des Lac5.5 cDNS Gens ein 110 bp großes Fragment amplifiziert. Ein 100 µl PCR-Ansatz enthielt jeweils 10 ng Lac5.5 cDNS (im pBK CMV-Vektor), 0,5 U Tth Polymerase, 1,25 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 mM der vier dNTPs und je 140 pmol des Primerpaares E und F, bzw.

35 des Primerpaares G und H. Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 5 min bei 94°C, gefolgt von 30 Zyklen von 1 min bei 94°C, 2 min bei 50°C und 1 min bei 72°C und schließlich 7 min bei 72°C.

Das DNS-Fragment aus der PCR-Reaktion mit den Primern E und F wurde zuerst mit Eco RI und Xma I geschnitten und anschließend durch Gelelektrophorese gereinigt und in den Vektor pLac5  
5 kloniert, der vorher mit Eco RI und Xma I geschnitten worden war. Dabei entstand der Vektor pLac51, bei dem am ATG-Codon des Translationsstarts eine Bsp HI Schnittstelle eingeführt wurde.

10 Das DNS-Fragment aus der PCR-Reaktion mit den Primern G und H wurde zuerst mit Eco RI und Xba I geschnitten und anschließend durch Gelelektrophorese gereinigt und in einen mit Eco RI und Xba I vorgeschneittenen pUC19 Vektor kloniert. Aus dem dabei  
15 entstanden Plasmid pLT5 wurde das ca. 100 bp große Insert mit Bbs I und Xba I herausgeschnitten. Das Bbs I - Xba I Fragment wurde schließlich in den mit Bbs I und Xba I geschnittenen Vektor pLac51 kloniert. Dadurch entstand der Vektor pLac513, der am 3'-Ende des Laccase cDNS Gens eine neue Afl II Schnitt-  
stelle enthielt.

20 Das cDNS Gen für die Trametes versicolor Laccase Lac5.5 mit den modifizierten 5'- und 3'-Bereichen wurde isoliert durch Partialverdau des Plasmids pLac513 mit Bsp HI. Dabei entstand  
ein 2,6 kb Fragment, das den kodierenden Bereich des Lac5.5  
25 cDNS Gens und ca. 1,1 kb des pUC19 Vektors enthielt. Dieses Fragment wurde in einem zweiten Schritt mit Afl II geschnitten und das dabei entstandene 1,5 kb große Lac5.5 cDNS Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde in das 7,4 kb große Afl II -  
Nco I Fragment des Vektors pAN52-12 ligiert, der ein 4,0 kb  
30 großes Fragment des glaA Promotors aus Aspergillus niger, ein 0,7 kb großes Fragment des trpC Transkriptionsterminators aus Aspergillus nidulans und das 2,7 kb große Fragment des pUC18 Vektors enthielt. Der dabei entstandene 8,8 kb große Vektor wurde pANlacI genannt. In pANlacI war die glaA Promotorregion  
35 über eine Nco I - Bsp HI Kreuzung funktionell mit dem Translationsstart ATG-Kodon des Laccase cDNS Gens verknüpft.

B: Verknüpfung der Laccase Lac5.5 cDNS mit dem glaA Promotor  
über einen Austausch der N-terminalen Signalsequenz gegen ein  
Fragment der Glucoamylase

- 5 Für die Modifizierung des für den N-Terminus der reifen Laccase Lac5.5 kodierenden Bereichs des cDNS Gens wurden die Primer I und F verwendet.

Primer I: 5'-CCGGAATTCGATATCCAAAGCGCGGGATCGGGCCTGTGCTCGAC-3'

10 (SEQ ID NO:13)

Unterstrichen in Primer I ist eine Eco RV Schnittstelle.

- Zur Modifizierung des 3'-Bereiches des Lac5.5 cDNS Gens wurden die Primer G und H verwendet (siehe Abschnitt A dieses  
15 Beispiels).

- Mit den Primern I und F wurde im 5'-Bereich des Lac5.5 cDNS Gens ein 110 bp großes Fragment durch eine PCR-Reaktion amplifiziert. Mit den Primern G und H wurde im 3'-Bereich des  
20 Lac5.5 cDNS Gens ein 110 bp großes Fragment amplifiziert. Die PCR-Reaktionen wurden, wie in Abschnitt A dieses Beispiels beschrieben, durchgeführt.

- Das DNS-Fragment aus der PCR-Reaktion mit den Primern I und F  
25 wurde zuerst mit Eco RI und Xma I geschnitten und anschließend durch Gelelektrophorese gereinigt und in den Vektor pLac5 kloniert, der vorher mit Eco RI und XmaI geschnitten worden war. Dabei entstand der Vektor pLac52, bei dem im 5'-Bereich vor dem Kodon für die erste Aminosäure des reifen Laccaseproteins  
30 eine Eco RV Schnittstelle gefolgt von den Kodons für die Aminosäuren der Sequenz Ile Ser Lys Arg (Seq ID NO:14) eingeführt worden waren. Diese Sequenz ist eine Erkennungsstelle für die KEX2 Protease. Der 3'-Bereich des Laccase cDNS Gens im Vektor pLac52 wurde modifiziert wie für den Vektor pLac51 be-  
35 schrieben. Aus dem Plasmid pLT5 wurde das ca. 100 bp große Insert aus der PCR-Reaktion mit den Primern G und H mit Bbs I und Xba I herausgeschnitten und isoliert. Das Bbs I - Xba I Fragment wurde schließlich in den mit Bbs I und Xba I

geschnittenen Vektor pLac52 kloniert. Dadurch entstand der Vektor pLac523, der am 3'-Ende des Laccase cDNS Gens eine neue Afl II Schnittstelle enthielt.

- 5 Das cDNS Gen für die *Trametes versicolor* Laccase Lac5.5 mit den modifizierten 5'- und 3'-Bereichen wurde gewonnen, indem das Plasmid pLac523 mit Eco RV und Afl II geschnitten und das dabei entstandene 1,5 kb große Lac5.5 cDNS Fragment nach Agarose-Gelelektrophorese isoliert worden war. Dieses Fragment  
10 wurde in das 9,3 kb große Afl II - Eco RV Fragment des Vektors pAN56-9 ligiert. Vektor pAN56-9 enthielt ein 4,0 kb großes Fragment des glaA Promotors aus *Aspergillus niger*, gefolgt von einem 2,0 kb großen Fragment, das für ein Fragment der *Aspergillus niger* glaA Glucoamylase kodiert, einem kurzen DNS-Abschnitt, der für vier Aminosäuren der KEX2-Spaltstelle kodiert, ein 0,7 kb großes Fragment des trpC Transkriptionsterminators aus *Aspergillus nidulans* und das 2,7 kb große Fragment des pUC18 Vektors. Die Eco RV und Afl II Schnittstellen waren 3' zur KEX2-Spaltstelle angeordnet. Nach Transformation  
15 in *E. coli* erhielt man einen 10,8 kb großen Vektor, der pANlac2 genannt wurde. In pANlac2 war der kodierende Bereich des cDNS Gens für die reife Laccase Lac5.5 so mit dem kodierenden Bereich des Glucoamylasegens verknüpft, daß bei der Expression zuerst ein Fusionsprotein aus einem Bruchstück der Glucoamylase inklusive Signalsequenz, der Erkennungssequenz  
20 für die KEX2 Protease und der vollständigen Laccase Lac5.5 entstand. Bei der Sekretion wird dieses Fusionsprotein durch die KEX2 Protease gespalten und die reife Laccase in den Kulturüberstand sekretiert.

30

2: Einbau der amdS und pyrG Selektionsmarker in die Vektoren pANlac1 und pANlac2

- pANlac1 und pANlac2 wurden linearisiert durch Verdau von je 5  
35 µg der Vektoren über Nacht mit Not I. Darauf folgte eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm, Extraktion mit Phenol/Chloroform und Fällung mit Ethanol. Die Gene für die Selektionsmarker amdS (Acetamidase) und pyrG

(Crotidin-5'-Monophosphat-Decarboxylase) waren auf dem Plasmid pAN52-11 enthalten, aus dem sie nach Verdau mit Not I als ein 6,4 kb großes Fragment isoliert werden konnten. Je 0,2 µg der linearisierten und Phosphatase-behandelten Vektoren pANlac1 und pANlac2 wurden mit 0,6 µg des isolierten Not I Fragments ligiert und damit E. coli JM109 transformiert. Von Ampicillin-resistenten Kolonien aus diesen Transformationen wurde die Plasmid-DNS präpariert, mit Not I geschnitten und durch Agarose Gelelektrophorese analysiert. 6 von 8 analysierten Klonen aus der Transformation mit dem Vektor pANlac1 und 5 von 7 analysierten Klonen aus der Transformation mit dem Vektor pANlac2 enthielten das 6,4 kb Not I Fragment. Die mit den Selektionsmarkergenen ausgestatteten Vektoren wurden als pANlac1S (Größe 15,3 kb, Fig.1) und pANlac2S (Größe 17,2 kb, Fig.2) bezeichnet. 3 der 6 erhaltenen pANlac1S Klone enthielten das Not I Fragment in der gewünschten, in Fig.1 angegebenen Orientierung, 1 der 5 erhaltenen pANlac2S Klone enthielt das Not I Fragment in der gewünschten, in Fig. 2 angegebenen Orientierung.

## 7. Beispiel

### Transformation von Aspergillus

Für die Transformation wurden die Stämme *Aspergillus niger* AB1.13 (pyrG<sup>-</sup>) (W. van Hartingsveldt, I.E. Mattern, C.M.J. van Zeijl, P.H. Pouwels und C.A.M.J.J. van den Hondel (1987) Mol. Gen. Genet. 206, 71 - 75) und *Aspergillus awamori* (Stamm ATCC 11358) verwendet. Die Transformation von *Aspergillus* wurde nach dem Stand der Technik durchgeführt (P. J. Punt und C.A.J.J. van den Hondel (1992), Meth. Enzymology 216, 447-457)

Protoplasten von *Aspergillus* wurden durch Behandlung des Mycels mit Novozym 234 gewonnen. In einem sterilen Erlenmeyerkolben wurde Mycelium eines Kolbens in 15 ml einer frisch hergestellten und sterilfiltrierten Lösung des lytischen Enzymgemisches Novozym 234 (Novo Nordisk) in OM-Medium (0,27 M Calciumchlorid, 0,6 M NaCl) suspendiert. Das in der Enzymlösung resuspendierte Mycelium wurde bei geringer Drehzahl (80 rpm) für

1 bis 3 h bei 30°C inkubiert. Während der Inkubation wurde die Bildung der Protoplasten im Mikroskop beobachtet. Frei bewegliche Protoplasten waren üblicherweise nach 1 h zu sehen. Nachdem eine große Zahl frei beweglicher Protoplasten erhalten worden war, wurden sie durch Filtration über Miracloth (Calbiochem) in einem Glasfilter von restlichem Mycelium abgetrennt und sorgfältig mit STC-Medium (1,2 M Sorbitol, 50 mM Calciumchlorid, 35 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) gewaschen. Protoplasten wurden durch Zentrifugation der Suspension in einem sterilen Probengefäß isoliert (2000 rpm, 4°C, 10 min) und zweimal mit STC-Medium gewaschen. Die Konzentration von Protoplasten wurde unter dem Mikroskop in einer Zählkammer bestimmt. Die Protoplastensuspension wurde für Experimente zur Protoplastenregenerierung oder für Transformationen auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Protoplasten/ml eingestellt.

Protoplasten von *Aspergillus niger* und *Aspergillus awamori* wurden mit den Plasmiden pANlac1S und pANlac2S transformiert. Beide Plasmide enthielten als Selektionsmarker das pyrG Gen (kodiert für die Orotidin 5'-Phosphat Decarboxylase) und das amdS Gen (kodiert für Acetamidase). In Inkubationsgefäßen von 12 ml Volumen wurden 0,1 ml Aliquots der Protoplasten mit 10 µg Plasmid-DNS versetzt und 25 min auf Eis inkubiert. Danach wurde langsam und unter wiederholtem Mischen 1,25 ml einer 60 % PEG4000 Lösung (60 % PEG4000, 50 mM Calciumchlorid, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) zum Transformationsansatz gegeben. Nach weiteren 20 min Inkubation bei 20°C wurden die Reaktionsgefäße mit STC-Medium aufgefüllt, gemischt und 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden resuspendiert und auf mit Sorbitol osmotisch stabilisiertem, selektivem Medium ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 7 Tage inkubiert und auf Wachstum von Kolonien überprüft. Die Transformationsrate aus mehreren Experimenten betrug für *Aspergillus niger* 1 - 5 Transformanten/µg Plasmid DNS, für *Aspergillus awamori* 0,1 - 0,5 Transformanten/µg Plasmid DNS.

Transformanten wurden durch Überimpfen auf Selektivplatten mit Acetamid gereinigt. Transformanten mit hoher Kopienzahl wurden



durch plattieren auf Selektivplatten mit Acrylamid identifiziert. Acrylamid ist im Gegensatz zu Acetamid ein schlechtes Substrat für das vom amdS Gen kodierte Enzym Acetamidase und kann nur bei Transformanten mit hoher Kopienzahl des amdS Gens das Wachstum unterstützen. Transformanten, die Laccaseenzym funktionell exprimieren können, wurden identifiziert, indem sie zuerst auf Platten mit Maltodextrin, einem Induktor für die Expression vom glaA Promotor, ausplattiert und nach zwei Tagen Wachstum bei 28°C mit ABTS-Agar (0,1 % ABTS, 1 % Agarose, in McIlvaine-Puffer, pH 4,5) überschichtet wurden. Laccase exprimierende Transformanten wurden durch Bildung eines grünen Hofes angezeigt. Von Transformanten, die sowohl auf Acrylamidplatten gutes Wachstum zeigten als auch im Aktivitätstest mit ABTS positiv reagierten, wurden Sporensuspensionen hergestellt.

#### 8. Beispiel

##### Expression der *Trametes versicolor* Laccase Lac5.5 in *Aspergillus*

Die Expression von Laccase Lac5.5 in *Aspergillus* wurde im Schüttelkolbenmaßstab untersucht. Es wurde folgendes Anzuchtmedium verwendet: Eine 5 % (w/v) Lösung von Maltodextrin in Leitungswasser wurde 20 min autoklaviert. Dann wurden zu 500 ml dieses Grundmediums 1 ml 1M MgSulfat, 0,5 ml 1000 x Spurenelementlösung, 10 ml 50 x Asp A Lösung und 5 ml 10 % (w/v) Casaminsäuren zugegeben. Die 1000 x Spurenelementlösung hatte folgende Zusammensetzung: In 80 ml H<sub>2</sub>O waren gelöst 2,2 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 1,1g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0,5 g MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 0,5 g FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,17 g CoCl<sub>2</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 0,16 g CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O, 0,15 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O und 5 g EDTA. Die 50 x AspA Lösung hatte die Zusammensetzung: In 500 ml H<sub>2</sub>O waren gelöst 150 g NaNO<sub>3</sub>, 13 g KCl, 38 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,5 mit 10 M KOH eingestellt. Dem Medium wurde zusätzlich CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O in einer Endkonzentration von 0,5 mM zugesetzt.

Für Expressionsexperimente wurden 50 ml des Anzuchtmediums in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit  $1 \times 10^6$  Sporen/ml inokuliert. Die Anzucht erfolgte in einem Schüttelinkubator bei

30°C und 300 rpm. Während einer Woche wurden täglich Proben entnommen und die Laccaseaktivität im Kulturüberstand bestimmt. Die maximale Laccaseaktivität wurde zwischen 60 und 100 h Wachstum beobachtet und betrug zwischen 0,5 und 2,5 U/ml. Die Laccaseaktivität wurde colorimetrisch mit dem Substrat ABTS (0,1 mM im Test) in McIlvaine Puffer pH 4,5 und bei 37°C bestimmt. McIlvaine Puffer wurde hergestellt, indem man eine 0,1 M Zitronensäurelösung mit 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Lösung auf pH 4,5 titrierte. Die Extinktionszunahme wurde bei 420 nm Extinktionskoeffizient von ABTS bei 420 nm:  $3,6 \times 10^4 \text{ l} \times \text{Mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  gemessen. 1 U Laccaseaktivität wurde definiert als 1 µmol ABTS-Substratumsatz/min.

#### 9. Beispiel

##### 15 Expression der Trametes versicolor Laccase Lac5.5 in Pichia pastoris

Es wurde ein kommerziell erhältliches Expressionssystem der Fa. Invitrogen mit den dazugehörigen Expressionsvektoren (pPIC3 und pPIC9) und Pichia pastoris Stämmen (GS115 und KM71) verwendet. Die Pichia pastoris Stämme GS115 und KM71 sind Histidin auxotroph. Die Expressionsvektoren enthielten Promotor und Terminator des Alkoholoxidasegens AOX1 aus Pichia pastoris. Zwischen diese beiden genetischen Regulationselementen wurde das cDNS Gen der Trametes versicolor Laccase Lac5.5 kloniert. Der Vektor pPIC9 enthielt, hinter dem AOX1 Promotor angeordnet, eine DNS-Sequenz, die für die Signalsequenz des alpha-Faktor Proteins aus Saccharomyces cerevisiae kodiert, gefolgt von einem kurzen DNS-Abschnitt, der für die Erkennungssequenz Glu-Lys-Arg-Glu-Ala-Glu-Ala (Seq ID NO:15) kodiert. Für die Selektion in E. coli enthielten die Vektoren das Ampicillin Resistenzgen. Für die Selektion in Pichia pastoris enthielten die Vektoren das HIS4 Gen aus Pichia pastoris.

##### 35 A: Konstruktion eines Laccase Lac5.5 Expressionsvektors mit der Signalsequenz von Laccase Lac5.5

Zur Amplifikation des Laccasegens wurde das Plasmid pLac5.5 und die Primer K und L verwendet. Primer F und G hatten folgende Sequenz:

5 Primer K:

5'-ACTCGAGAAATTCACCATGACTGGGCTGCGTCTTCTTCC-3' (SEQ ID NO:16)

Primer L:

5'-ACTAGAGCGGCGCCTATCACTGGTTCGTACGTCGAGGGC-3' (SEQ ID NO:17)

- 10 Primer K enthielt die Sequenz für eine Eco RI Schnittstelle (unterstrichen) und daran angeschlossen die DNS-Sequenz für die ersten sieben Aminosäuren der Laccase Lac5.5 Signalsequenz. Primer L enthielt die Sequenz für eine Not I Schnittstelle (unterstrichen) und daran angeschlossen, in komplementärer und reverser Orientierung, das Translationsstopcodon und  
15 die DNS-Sequenz für die letzten 7 Aminosäuren der Laccase Lac5.5.

- PCR-Amplifikationen wurden nach dem für den Fachmann geläufigen Stand der Technik durchgeführt. 20 ng pLac5.5 DNS wurden  
20 in einer 50 µl PCR Reaktion eingesetzt, die darüberhinaus 0,5 U Vent Polymerase, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,2 mM der vier dNTPs und jeweils 100 pmol der Primer K und L enthielt. Die weiteren Bedingungen zur spezifischen Amplifikation des gewünschten  
25 PCR-Produkts waren: 5 min bei 94°C, gefolgt von 25 Zyklen von 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C und 2 min bei 72°C. Es wurde das erwartete PCR-Fragment der Größe von 1,5 kb erhalten. Das PCR-Fragment wurde durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Not I geschnitten, mit  
30 Ethanol gefällt und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Vektor pPIC3 wurde mit Eco RI und Not I geschnitten, durch Agarose-Gelelektrophorese gereinigt, isoliert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Es folgte eine Extraktion mit Phenol/Chloroform (Verhältnis 3:1) und eine Ethanolfällung. In den so vorbereiteten  
35 pPIC3-Vektor wurde das durch PCR-Amplifikation hergestellte DNS-Fragment der Laccase Lac5.5 ligiert und damit E. coli Top 10F' Zellen (Invitrogen) transformiert. Von Ampicillin-resistenten Klonen wurde die Plasmid DNS isoliert und das

klonierte 1,5 kb Insert durch Restriktionsverdau mit Eco RI und Not I identifiziert. Von 12 untersuchten Klonen waren 9 positiv. Der so erhaltene Vektor wurde mit dem Namen pL512 (Fig.3) bezeichnet.

E

B: Konstruktion eines Laccase Lac5.5 Expressionsvektors mit der Signalsequenz des alpha-Faktors aus Saccharomyces cerevisiae

10 Zur Amplifikation des Laccasegens wurde das Plasmid pLac5.5 und die Primer L und M verwendet. Primer M hatte folgende Sequenz:

Primer M:

15 5'-ACTCGAGAAATTCGGGATCGGGCCTGTGCTCGACCTCACG-3' (SEQ ID NO:16)

Primer M enthielt die Sequenz für eine Eco RI Schnittstelle (unterstrichen) und daran angeschlossen die DNS-Sequenz für die ersten neun Aminosäuren des vermuteten N-terminus der pro-

20 zessierten Laccase Lac5.5. Der N-terminus der prozessierten Laccase Lac5.5 war aus dem Sequenzvergleich mit anderen Laccasen abgeleitet worden.

Die Herstellung des DNS-Fragments für die prozessierte Form

25 der Laccase Lac5.5 erfolgte, wie in Abschnitt A dieses Beispiels beschrieben, durch PCR-Amplifikation mit pLac5.5 cDNS und den Primern L und M. Der Vektor pPIC9 wurde mit Eco RI und Not I geschnitten und wie der in Abschnitt A dieses Beispiels beschriebene pPIC3 Vektor vorbereitet, mit dem durch PCR-

30 Amplifikation hergestellten DNS-Fragment der Laccase Lac5.5 ligiert und damit E. coli Top 10F' Zellen (Invitrogen) transformiert. Von Ampicillin-resistenten Klonen wurde die Plasmid DNS isoliert und das klonierte 1,5 kb Insert durch Restriktionsverdau mit Eco RI und Not I identifiziert. Von 12 unter-

35 suchten Klonen waren 3 positiv. Der so erhaltene Vektor wurde mit dem Namen pL532 (Fig.4) bezeichnet.

C: Transformation von Pichia pastoris

*Pichia pastoris* Stämme GS115 bzw. KM71 wurden zuerst in 5 ml YPD-Medium (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 2 % Dextrose) bei 30°C über Nacht kultiviert. Mit je 0,2 ml dieser Vorkultur wurden zwei Hauptkulturen von je 250 ml YPD-Medium inokuliert und wiederum bei 30°C über Nacht bis zu einer optischen Dichte (OD600 nm) von 1,3 - 1,5 kultiviert. Die Hefezellen einer 250 ml Hauptkultur wurden daraufhin abzentrifugiert (5 min 1500 x g), zweimal mit je 200 ml H<sub>2</sub>O und einmal mit 10 ml 1 M Sorbitol gewaschen und schließlich in 0,5 ml 1 M Sorbitol aufgenommen.

Plasmid DNS der Vektoren pL512 oder pL532 wurden entweder mit *Stu* I oder mit *Nsi* I linearisiert, mit Ethanol gefällt und in H<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 1 µg DNS/µl aufgenommen. Ein Transformationsansatz enthielt 80 µl *Pichia pastoris* Zellen und 10 µg linearisierte Vektor-DNS. Transformation erfolgte durch Elektroporation bei 1500 V, 25 µF und 200 Ohm (BioRad Gene Pulser). Die Entladungszeit betrug ca. 4,2 msec. Der Transformationsansatz wurde mit 1 ml 1 M Sorbitol versetzt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend in Aliquots zu je 0,3 ml auf MD-Platten ohne Histidin (1,34 % YNB, Hefe Stickstoffbase,  $4 \times 10^{-5}$  % Biotin, 1 % Dextrose, 1,5 % Agar) ausplattiert. Transformanten erschienen nach 3 - 5 Tagen Inkubation bei 30°C. Transformanten wurden durch zweimaliges Ausstreichen auf MD-Platten gereinigt. Laccaseproduzenten wurden auf MM-Indikatorplatten identifiziert. MM-Indikatorplatten enthielten 1,34 % YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % Biotin, 0,5 % Methanol, 1,5 % Agar, 1 mM ABTS und 0,1 mM CuSulfat. Der Induktor Methanol wurde im Deckel der Petrischalen vorgelegt und täglich erneuert, um eine Versorgung der Kolonien mit Methanol durch Diffusion zu gewährleisten. Laccaseproduzenten erzeugten nach 2 - 3 Tagen Inkubation bei 30°C einen grünen Hof.

#### 35 E: Expression in Schüttelkolben:

50 ml BMGY Medium (1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 0,1 M K-Phosphat, pH 6,0, 1,34 % YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % Biotin, 1 % Glycerin)

wurden mit einer Laccase produzierenden *Pichia pastoris* Transformante inkuliert und 48 h bei 28°C und 300 rpm auf einem Schüttler kultiviert. Die Zellen dieser Vorkultur wurden durch Zentrifugation (10 min 1500 x g) isoliert und in 10 ml Hauptkulturmedium (MMY, 1 % Hefeextrakt, 2 % Pepton, 1,34 % YNB,  $4 \times 10^{-5}$  % Biotin, 3 % Methanol) suspendiert. MMY-Medium wurde mit 0,5 mM CuSulfat supplementiert und die Hauptkultur bei Raumtemperatur und 300 rpm auf einem Schüttler weiterkultiviert. In Abständen von 24 h wurde die Hauptkultur mit Methanol (0,6 ml/10 ml Medium) supplementiert. Die Produktion der rekombinanten Laccase Lac5.5 setzte nach 24 h ein. Produktionsraten bis zu 4 U/ml nach 190 h nach Start der Hauptkultur wurden erreicht.

#### 10. Beispiel

##### Isolierung von rekombinanter Laccase Lac5.5

Rekombinante Laccase Lac5.5 wurde durch Anzucht transformierter *Aspergillus*stämme im Schüttelkolben gewonnen, wie im 8. Beispiel beschrieben. Laccase Lac5.5 enthaltende Kulturüberstände wurden durch Querstromfiltration konzentriert. Dazu wurden Sartoclon Micro Filtrationsmodule (Sartorius) mit einer Ausschlussgrenze von 30 kD verwendet. Konzentrierte Laccase Lac5.5 wurde anschließend lyophilisiert und in 20 mM Na-Phosphat, pH 6.0 gelöst. Die Aktivität der konzentrierten rekombinanten Laccase Lac5.5 betrug 18,6 U/ml.

Nach Querstromfiltration konzentrierte Laccase wurde gegen 20 mM BisTris-HCl, pH 6.5 dialysiert. Danach wurde eine Leitfähigkeit von 1,5 mS/cm gemessen. Dialysierte Laccase wurde anschließend über eine Säule von DEAE Sepharose (Pharmacia), äquibriert in 20 mM BisTris-HCl (Auftragspuffer), pH 6.5, chromatographiert. Unter diesen Bedingungen bindet die Laccase an die DEAE Sepharose. Bei der Elution mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in Auftragspuffer wurde die Laccaseaktivität bei einer Salzkonzentration von 0,15 M NaCl wiedergefunden. Die Laccasefraktion von der DEAE Sepharosesäule wurde mit Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 20 % sowie

mit Na-Acetat, pH 4.5 (Endkonzentration 20 mM) versetzt und pH 4,5 mit Essigsäure eingestellt. Die so vorbereitete Laccasefraktion wurde dann über eine Säule von Phenylsepharose (Pharmacia), äquiliibriert in Auftragspuffer (20 mM Na-Acetat, pH 4,5, 20 % gesättigtes Ammoniumsulfat), chromatographiert. Unter diesen Bedingungen bindet die Laccase an die Phenylsepharose. Bei der Elution mit einem linearen Gradienten von 20 - 0 % gesättigtem Ammoniumsulfat, in 20 mM Na-Acetat, pH 4,5 wurde die Laccaseaktivität bei einer Ammoniumsulfatsättigung von 16 % wiedergefunden. Die Laccasefraktion wurde gegen 20 mM Bis-Tris-HCl, pH 6.5 dialysiert und durch Bindung an DEAE Sepharose und anschließender Stufenelution mit 0,3 M NaCl konzentriert. Bindung und Elution mit 0,3 M NaCl erfolgten jeweils in 20 mM BisTris-HCl, pH 6.5. Die Ausbeute an Laccaseaktivität bezogen auf das Startmaterial betrug 20 %. Die isolierte Laccase wurde durch N-terminale Aminosäuresequenzierung analysiert. Die dabei bestimmte Sequenz,

Gly Ile Gly Pro Val Leu Asp Leu Thr Ile Ser Arg Ala Val (SEQ ID NO:19)

befand sich in Übereinstimmung mit dem aus der cDNS-Sequenz und Homologievergleichen abgeleiteten N-terminus der reifen Laccase Lac5.5.

## 11. Beispiel

### Biochemische Eigenschaften von rekombinanter Laccase Lac5.5

Es wurden das pH- und Temperaturoptimum sowie die pH- und Temperaturstabilität von rekombinanter Laccase Lac5.5, in Aspergillus hergestellt wie im 8. Beispiel beschrieben, untersucht. Für diese Experimente wurde rekombinante Laccase Lac5.5 zuerst über Sephadex G25 (Pharmacia, PD10-Säulen) in McIllvaine-Puffer, pH 4.5 umgepuffert.

#### A: pH-Optimum:

Es wurden für die in Fig.5 angegebenen pH-Werte jeweils die entsprechenden Puffer durch geeignetes mischen von

ungepufferten Na-Citrat- und Na-Phosphatlösungen hergestellt. Für rekombinante Laccase Lac5.5 wurde anschließend beim jeweiligen pH-Wert die Laccaseaktivität bei 37°C bestimmt. Wie aus Fig.5 hervorgeht, hat die Laccase Lac5.5 für das Substrat ABTS ein Aktivitätsoptimum im stark sauren Bereich.

#### B: pH-Stabilität:

Laccase Lac5.5 wurde in McIlvaine Puffer bei pH 3,0, 4,5 und 6,0 vorinkubiert (Temperatur 37°C). Nach 0, 30, 60 und 120 min wurden jeweils Aliquots entnommen, in McIlvaine Puffer mit pH 4,5 verdünnt und die Laccaseaktivität bei 37°C bestimmt. Bei pH 4,5 und 6,0 wurde die Laccaseaktivität durch die Vorbehandlung nicht beeinträchtigt. Bei pH 3,0 betrug die Halbwertszeit der Laccase zwischen 60 und 120 min. (Fig.6).

#### C: Temperaturoptimum:

Die Laccaseaktivität der rekombinanten Laccase Lac5.5 wurde bei den in Fig.7 angegebenen Temperaturen bestimmt. Die Laccaseaktivität wurde mit dem ABTS-Test in McIlvaine-Puffer, pH 4,5 bestimmt. Überraschenderweise wurde dabei festgestellt, daß das Temperaturoptimum der Laccase Lac5.5 bei 70°C liegt. Die Temperaturen, bei der noch halbmaximale Laccaseaktivität gemessen wurde, liegen bei 50°C und 80°C.

#### D: Temperaturstabilität:

Laccase Lac5.5 wurde in McIlvaine Puffer pH 4,5 bei 45, 55 und 65°C vorinkubiert. Nach 0, 30, 60 und 120 min wurden jeweils Aliquots entnommen, in McIlvaine Puffer mit pH 4,5 verdünnt und die Laccaseaktivität bei 37°C bestimmt. Bei 45°C wurde die Laccaseaktivität durch die Vorbehandlung nicht beeinträchtigt. Bei 55°C wurden nach 120 min Vorinkubation noch 80 % Restaktivität gemessen. Bei 65°C betrug die Halbwertszeit der Laccase 60 min. (Fig.8).



## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Consortium fuer elektrochemische Industrie  
GmbH

(B) STRASSE: Zielstattstrasse 20

(C) ORT: Muenchen

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: D-81379

(G) TELEPHON: 089 74844 0

(H) TELEFAX: 089 74844 350

(ii) ANMELDETITEL: DNS-Sequenzen. Expression dieser DNS-Sequenzen. durch die DNS-Sequenzen kodierte thermophile Laccasen sowie deren Verwendung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 19

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1572 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Trametes versicolor*

(B) STAMM: TV-1

## (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: plac55

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG. SEQ ID NO: 1:

ATGACTGGGC TGCCTCTTCT TCCTTCCTTC GCGGCGTTGG CCGTGACCGT GTCTCTCGCG

60

CTCAACGCGT TGGCTGGGAT CGGGCOTGTG CTCGACCTCA CGATCTCCAA CGCGGTGGTG

120

TCGCCCGATG GCTTCTCTCG CGCGGCGGTC GTTGCGAAG ACCAGGCTCC CGGGCCTCTC

180

ATTACGGGCC AGATGGGCGA CCGTTTCCAG ATCAATGTGG TCAACAAGCT GTCGAACCAC

240

ACTATGCTCA AGTCGACCAG CATCCACTGG CACGGCTTCT TCCAGAAGGG TACGAACTGG

300

GCCGATGGCC CCGCGTTCGT GAACCAGTGC CCGATCGCGA CTGGTCACTC GTTCCTTTAC

360

GACTTCCAGG TCCCGGACCA GGCCGGGACG TTCTGGTACC ACAGCCATTT GTCTACCCAG

420

TACTGTGACG GGTTGAGAGG TCCTTTCGTC GTCTACGACC CGAACGACCC TCATGCCAGC

480

CTCTACGACG TGGACAACGA TGACACCGTC ATCACCTCG CTGACTGGTA CCATACCGCT

540

GCCAAGCTTG GGCCGGCCTT CCCTCCTGGC TCTGATGCGA CGTTGATCAA TGGGCTCGGA

600

CGTACAGCGG CCACCCCCAA CGCGGATCTC GCTGTCATTA GTGTCACGCA CGGCAAGCGG  
660

5 TACCGTTTCC GCCTGGTGTC GATGTCCTGC GACCCCGCGT ACACGTTTAC CATCGACGAC  
720

CACTCGATGA CCATCATCGA GCGGGAATCA GTCAACACAA AGCCGCTCGA GGTGGAATCG  
780

10 ATCCAGATCT TCGCCGGCCA GCGCTACTCG TTCGTGCTGG AGGCAAACCA GGACGTCGGC  
840

AACTATTGGG TCCGCGCGGA CCGCTGTTT GGCACGACGG GCTTCGATGG GGGTATCAAC  
900

15 TCTGCGATCC TCCGGTACGA CACCGCGTCG CCGACCGAGC CGACCACGAC GCAGGCCACC  
960

20 TCTACGAAGC CGTTGAAGGA GACGGACCTT GAGCCTCTCG CGTCGATGCC GGTGCCTGGC  
1020

TCTGCTGTCT CGGGTGGTGT GGACAAGGCG ATTAACCTCG CTTTCAGCTT CAACGGGTCC  
1080

25 AACTTCTTCA TCAACGGCGC GACCTTCCAG CCGCCACCA CTCCGTTCT GCTGCAGATC  
1140

ATGAGCGGTG CCCAGGCTGC TAGCGACCTC CTCCGTCGG GTGACGTCTA CGCCCTGCCG  
1200

30 TCGGACTCGA CCATCGAGCT CTCGTTCCCC GCGACTACTG GTGCTCCCGG TGCCCCCAC  
1260

CCCTTCCACT TGCACGGTCA CACCTTCGCC GTTGTGCGCA GCGCGGGCAG CGCTGAGTAC  
1320

35 AACTACGACA ACCCATCTG GCGCGACGTC GTCAGCACTG GTACCCCTGC AGCGGGCGAT  
1380

AACGTCACCA TCGGTTTCAG GACTGACAAC CCTGGCCCGT GGTTCCTCCA CTGCCACATC  
1440

GACTTCCACT TGGAGGCCGG CTTCGCCGTG GTCATGGCTG AAGACATCCC CGACACCAAG  
1500

GCCGACAACC CTGTTCTCA GCGGTGGTCA GACCTTTGCC CCATCTACGA CGCCCTCGAC  
1560

GCTGACGACC AG 1572

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1572 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Trametes versicolor

(B) STAMM: TV-1

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: plac56

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ATGACTGGGC TCGTCTTCT TCCTTCCTTC GCGGCGTTGG CCGTGACCGT GTCGCTCGCG  
60

CTCAACGCGT TGGCCGGGAT CGGGCCCGTG CTCGACCTTA CGATCTCAA TGCGGTTGTT  
120

5 TCGCCCGATG GCTTCTCTCG CGCGGCGGTC GTCGCGAACG ACCAGGCTCC CGGGCCTCTC  
180

ATCACGGGCC AGATGGGCGA CCGCTTCCAG ATCAATGTGG TCAACAAGCT GTCGAACCAC  
240

10 ACCATGCTTA AATCGACCAG CATCCACTGG CACGGCTTCT TCCAGAAGGG CACGAACTGG  
300

GCGGACGGCC CTGCGTTCGT GAACCAATGC CCGATTGCGA CGGGCCACTC GTTCCTTTAC  
360

15 GACTTCCAGG TCCCGGACCA GGCCGGGACG TTCTGGTACC ACAGCCATCT GTCTACTCAG  
420

TACTGCGATG GCTTGAGGGG TCCGTTCTGTC GTCTACGACC CGAATGACCC TCATGCCAGT  
480

20 CTCTACGATG TGGACAACGA TGACACCGTC ATCACCTCG CCGATTGGTA CCATACTGCT  
540

GCCAAGCTTG GGCCGGCCTT CCCTCCTGGC TCTGATGCGA CGTTGATCAA TGGGCTCGGA  
25 600

CGTACAGCGG CCACCCCCAA CGCGGACCTC GCTGTCATCA GCGTCACGCA CGGCAAGCGG  
660

30 TACCGTTTCC GCCTGGTGTC GATGTCCTGC GACCCCGCGT ACACCTTCAG CATCGACGAC  
720

CACTCGATGA CCATCATCGA GGCGGACTCG GTCAACACGA AGCCGCTCGA GGTCGACTCG  
780

35 ATCCAGATCT TCGCCGGCCA GCGCTACTCG TTCGTGCTGG AGGCAAACCA GGACGTCGGC  
840

AACTATTGGG TCCGCGCGGA CCCGCTGTTT GGCACGACGG GCTTCGATGG GGGTATCAAC  
900

TCTGCGATCC TCCGGTACGA CACCGCGTCG CCGACCGAGC CGACCAAGAC GCAGGCCACC  
960

TCTACGAAGC CGTTGAAGGA GACGGACCTT GAGCCTCTCG CGTCGATGCC GGTGCCTGGC  
1020

TCTGCTGTGT CGGGTGGTGT GGACAAGGCG ATTAACCTCG CTTTCAGCTT CAACGGGTCC  
1080

AACTTCTTCA TCAACGGGCG GACCTTCAG CCGCCACCA CTCCCGTTCT GCTGCAGATC  
1140

ATGAGCGGTG CCCAGGCTGC TAGCGACCTC CTCCCGTCCG GTGACGTCTA CGCCCTGCCG  
1200

TCGGA CTGA CCATCGAGCT CTCGTTCCCC GCGACTACTG GTGCTCCCGG TGCCCCCCAC  
1260

CCCTTCCACT TGCACGGTCA CACCTTCGCC GTTGTGCGCA GCGCGGGCAG CGCTGAGTAC  
1320

AACTACGACA ACCCCATCTG GCGCGACGTC GTCAGCACTG GTACCCCTGC AGCGGGCGAT  
1380

AACGTACCA TTCGCTTCAG GACTGACAAC CCTGGCCCGT GGTTCCTCCA CTGCCACATC  
1440

GACTTCCACT TGGAGGCCGG CTTCGCCGTG GTCATGGCTG AAGACATCCC CGACACCAAG  
1500

GCCGACAACC CTGTTCTCA GCGTGGTCA GACCTTTGCC CCATCTACGA CGCCCTCGAC  
1560

GCTGACGACC AG

1572

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3

- 37 -

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 524 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

5

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: JA

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

10

(A) ORGANISMUS: Trametes versicolor

(B) STAMM: TV-1

## (ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein

15

(B) LÄNGE: 1..524

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

20

Met Thr Gly Leu Arg Leu Leu Pro Ser Phe Ala Ala Leu Ala Val Thr

1 5 10 15

Val Ser Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly Pro Val Leu Asp

20 25 30

25

Leu Thr Ile Ser Asn Ala Val Val Ser Pro Asp Gly Phe Ser Arg Ala

35 40 45

Ala Val Val Ala Asn Asp Gln Ala Pro Gly Pro Leu Ile Thr Gly Gln

50 55 60

30

Met Gly Asp Arg Phe Gln Ile Asn Val Val Asn Lys Leu Ser Asn His

65 70 75 80

Thr Met Leu Lys Ser Thr Ser Ile His Trp His Gly Phe Phe Gln Lys

35

85 90 95

Gly Thr Asn Trp Ala Asp Gly Pro Ala Phe Val Asn Gln Cys Pro Ile

100 105 110

Ala Thr Gly His Ser Phe Leu Tyr Asp Phe Gln Val Pro Asp Gln Ala  
115 120 125

5 Gly Thr Phe Trp Tyr His Ser His Leu Ser Thr Gln Tyr Cys Asp Gly  
130 135 140

Leu Arg Gly Pro Phe Val Val Tyr Asp Pro Asn Asp Pro His Ala Ser  
145 150 155 160

10 Leu Tyr Asp Val Asp Asn Asp Asp Thr Val Ile Thr Leu Ala Asp Trp  
165 170 175

Tyr His Thr Ala Ala Lys Leu Gly Pro Ala Phe Pro Pro Gly Ser Asp  
180 185 190

15 Ala Thr Leu Ile Asn Gly Leu Gly Arg Thr Ala Ala Thr Pro Asn Ala  
195 200 205

20 Asp Leu Ala Val Ile Ser Val Thr His Gly Lys Arg Tyr Arg Phe Arg  
210 215 220

Leu Val Ser Met Ser Cys Asp Pro Ala Tyr Thr Phe Ser Ile Asp Asp  
225 230 235 240

25 His Ser Met Thr Ile Ile Glu Ala Asp Ser Val Asn Thr Lys Pro Leu  
245 250 255

Glu Val Asp Ser Ile Gln Ile Phe Ala Gly Gln Arg Tyr Ser Phe Val  
260 265 270

30 Leu Glu Ala Asn Gln Asp Val Gly Asn Tyr Trp Val Arg Ala Asp Pro  
275 280 285

Leu Phe Gly Thr Thr Gly Phe Asp Gly Gly Ile Asn Ser Ala Ile Leu  
290 295 300

35 Arg Tyr Asp Thr Ala Ser Pro Thr Glu Pro Thr Thr Thr Gln Ala Thr  
305 310 315 320



- 39 -

Ser Thr Lys Pro Leu Lys Glu Thr Asp Leu Glu Pro Leu Ala Ser Met  
325 330 335

Pro Val Pro Gly Ser Ala Val Ser Gly Gly Val Asp Lys Ala Ile Asn  
5 340 345 350

Phe Ala Phe Ser Phe Asn Gly Ser Asn Phe Phe Ile Asn Gly Ala Thr  
355 360 365

Phe Gln Pro Pro Thr Thr Pro Val Leu Leu Gln Ile Met Ser Gly Ala  
10 370 375 380

Gln Ala Ala Ser Asp Leu Leu Pro Ser Gly Asp Val Tyr Ala Leu Pro  
385 390 395 400

Ser Asp Ser Thr Ile Glu Leu Ser Phe Pro Ala Thr Thr Gly Ala Pro  
15 405 410 415

Gly Ala Pro His Pro Phe His Leu His Gly His Thr Phe Ala Val Val  
420 425 430

Arg Ser Ala Gly Ser Ala Glu Tyr Asn Tyr Asp Asn Pro Ile Trp Arg  
20 435 440 445

Asp Val Val Ser Thr Gly Thr Pro Ala Ala Gly Asp Asn Val Thr Ile  
25 450 455 460

Arg Phe Arg Thr Asp Asn Pro Gly Pro Trp Phe Leu His Cys His Ile  
465 470 475 480

Asp Phe His Leu Glu Ala Gly Phe Ala Val Val Met Ala Glu Asp Ile  
30 485 490 495

Pro Asp Thr Lys Ala Asp Asn Pro Val Pro Gln Ala Trp Ser Asp Leu  
500 505 510

Cys Pro Ile Tyr Asp Ala Leu Asp Ala Asp Asp Gln  
35 515 520

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 17 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

5 (C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

10 (iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTISENSE: NEIN

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

TGGCAYGGNT TYTTYCA

17

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

20

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 14 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

25

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

30

(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

35

TCDATRTGRC ARTG

14

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

5 (C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

10 (iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTISENSE: NEIN

15 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

ATTCAGGGAT CCTGGTAYCA YWSNCAY

27

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

20

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

25 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

30 (iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

35

ATACGAGGAT CCRTGNCCRT GNARRTG

27

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA.

(A) LÄNGE: 3284 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

5 (C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

10 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

15 (A) ORGANISMUS: Trametes versicolor

(B) STAMM: TV-1

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: piac56chr

20

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8

TTGGAATGGG CCCGCCGGTG TCGATCGCAA ACAGGTGAGT TCAGTACTAG CCCATCAGCG

60

25

CAGCAGCATT TCGGGCGAAG AAGTGTCCGC CCCACGCTCA TCACCCAGCG CCCTTCTCGA

120

CATCGGAACC GCGCAACAC AGGGAAGAGG CCATTTCGCC CATCCAAGGC TCGGGGATCT

180

30

TCTCACGACG CGAGGGCATT TCGCGCGAGC GTCGCAGCCG GTGCGCCGAG GCTGCATGAT

240

CTGTGCGGCT CCTGCGCGTA TGCCGCTCGG GTCGCCGAGA CACAGCGAGA CATCTGCAGC

35

300

CGGGGCGGGC CGCAACCAGC TCGGCTGTTT GGAGTGCGTC GATGCAACGC GTCGACGTCC

360

ATCGGGGACG GCGCGTGGCT TGGCACGCGT AGCACCGACG CGCACTATAA AGGCGATGCG  
420

5 GCAGAGAAGA GGCGGAGCAC CACGTTCACT CCCTTCCTTG GATTCCGGGC AGCTTACTCC  
480

TTCTCGCCTC TCTCTGCCTC CTTTCCTTCG GGCTTCTACT CTTCTTTTCT ATTTGCTTC  
540

10 TGTTGAGGG TAGAACACAG AACACTATGA CTGGGCTGCG TCTTCTTCCT TCCTTCGCGG  
600

CGTTGGCCGT GACCGTGTCT CTCGCGCTCA ACGCGTTGGC CGGGATCGGG CCCGTGCTCG  
660

15 ACCTTACGAT CTCCAATGCG GTTGTTTCGC CCGATGGCTT CTCTCGCGCG GCGGTCGTCTG  
720

CGAACGACCA GGCTCCCGGG CCTCTCATCA CGGGCCAGAT GGGCGACCGC TTCCAGATCA  
20 780

ATGTGGTCAA CAAGCTGTCT AACCACACCA TGCTTAAATC GACCAGCATC GTGAGTATTC  
840

25 AATCTGGGCG TGGGGGTACG GGCTGCACTG ACGCAAGTAC ACGCTTCGCA GCACTGGCAC  
900

GGCTTCTTCC AGAAGGGCAC GAACTGGGCG GACGGCCCTG CGTTCGTGAA CCAATGCCCG  
960

30 ATTGCGACGG GCCACTCGTT CCTTTACGAC TTCCAGGTCC CGGACCAGGC CGGTATGTGA  
1020

TCACGGAAGG TGTGCACGAA CCCAGCACTG ACGGTCATGT AGGGACGTTT TGGTACCACA  
1080

35 GCCATCTGTC TACTCAGTAC TGCGATGGCT TGAGGGGTCC GTTCGTCGTC TACGACCCGA  
1140

ATGACCCCTCA TGCCAGTCTC TACGATGTGG ACAACGGTAA GCAGTTCAGA TTGCGAATCC  
1200

5 TTGGCGGTCT ATTGACATCC CGGCCAGATG ACACCGTCAT CACCCTCGCC GATTGGTACC  
1260

ATACTGCTGC CAAGCTTGGG CCGGCCTTCC CGTAAGTTGG ATTGTCAGTC TGTCTGTTCT  
1320

10 CTACTTACTA ATCACGGGCT GCAGTCCTGG CTCTGATGCG ACGTTGATCA ATGGGCTCGG  
1380

ACGTACAGCG GCCACCCCCA ACGCGGACCT CGCTGTCATC AGCGTCACGC ACGGCAAGCG  
1440

15 GTAAGAGCGG CTGTACCTTC CTCTTGCTCG CAGCTGCTCA AACTTTATGG TTTATAGGTA  
1500

CCGTTTCCGC CTGGTGTGGA TGTCTGCGA CCGCGGTAC ACCTTCAGCA TCGACGACCA  
1560

20 CTCGATGACC ATCATCGAGG CGGACTCGGT CAACACGAAG CCGCTCGAGG TCGACTCGAT  
1620

CCAGATCTTC GCCGGCCAGC GCTACTCGTT CGTGCTGGAG GCAAACCAGG ACGTCGGCAA  
25 1680

CTATTGGGTC CGCGCGGACC CGCTGTTTGG CACGACGGGC TTCGATGGGG GTATCAACTC  
1740

30 TCGATCCTC CGGTACGACA CCGCGTCGCC GACCGAGCCG ACCACGACGC AGGCCACCTC  
1800

TACGAAGCCG TTGAAGGAGA CGGACCTTGA GCCTCTCGCG TCGATGCCGG TGGTAAGTCT  
1860

35 GACTAGCACT TCATCTTTGA TGGTATGCTC ATGCAACTCT CCAGCCTGGC TCTGCTGTGT  
1920

CGGGTGGTGT GGACAAGGCG ATTAACCTCG CTTTCAGCTT CGTACGTCCA ACTCACGATT  
1980

5 TCCCCCTTGA GATTTATATT GATGGCTCCA TTGACGGCTC CTCATAGAAC GGGTCCAAC  
2040

TCTTCATCAA CGGCGCGACC TTCCAGCCGC CCACCACTCC CGTTCTGCTG CAGATCATGA  
2100

10 GCGGTGCCCA GGCTGCTAGC GACCTCCTCC CGTCCGGTGA CGTCTACGCC CTGCCGTCCG  
2160

ACTCGACCAT CGAGCTCTCG TTCCCCGCGA CTA CTGCTGCTG TCCCGGTGCC CCCCACCCCT  
2220

15 TCCACTTGCA CGGTGTAAGT TGTCATCTCA ATGTTCCGTT TGGGCCCCGA TACTAACGGC  
2280

TAGATAGCAC ACCTTCGCCG TTGTGCGCAG CGCGGGCAGC GCTGAGTACA ACTACGACAA  
2340

20 CCCCATCTGG CGCGACGTCG TCAGCACTGG TACCCCTGCA GCGGGCGATA ACGTCACCAT  
2400

25 TCGCTTCAGG GTGAGTTGCT ATCATTATCC CCTCCTGTGT AATCGGTCGC TGACAGTCCT  
2460

GCAGACTGAC AACCCCTGGCC CGTGGTTCCT CCACTGCCAC ATCGACTTCC ACTTGGAGGC  
2520

30 CGGCTTCGCC GTGGTCATGG CTGAAGACAT CCCCACACC AAGGCCGACA ACCCTGTTCC  
2580

TCGTGAGTAT TACCCCCCAA TCCCGTCAAG GCGCGCACTA ACAGGGTATT GCTGCAGAGG  
2640

35 CGTGGTCAGA CCTTTGCCCC ATCTACGACG CCCTCGACGC TGACGACCAG TGAACACGCC  
2700

TCACGAGATC GTCAACCATT TCCTCAATCA TTGACTTACC GACTTGCTAT TTCTAACACG  
2760

CTATTTGCGA ACCCCCGCTC TCCCTCTCT CACACTACGG TCCCTTCGTG AACATGGA  
2820

TGCATGGA CTGGATTGTA GAAAGTTTAC ACAGCTGTAT AGTCGAATTA TCCCGTAAT  
2880

GCATGGTAGT GCGGCTGGCC TTTACCTCAA TCATTGTTAT CATGATATGG CCATCATAAA  
2940

CATCACTGAC ATCTACTAAT CTGCTGTTAG TTTTGGGACC TCAAGAAGAT AAACGCCCGT  
3000

CTACCACGAT GTGACGCGCG CGATACGTGA ATGTGACTGA TCGCGTTCCA TTATTCAAAA  
3060

CGCGTCGGCT GCGGGCCAGG CCAAGTTGCT CCTCTCTCTC CGACGACGAC CACCCCTGGC  
3120

TCTCTTACCC ACCTTCTCTG CACCATGACG GCAGACTACA GACTACAGTC TCTCGACGAT  
3180

CCGACGGCGG TCATCCAAGA GCTCTACCGC GCCCATCCAG ACCCGAACGG TTTCCCCCGC  
3240

CTCGTTGCTG AGCACTTCCA AAAGCTCTTC GAGAACCGAA CATG 3284

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA



(iii) ANTISENSE: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CCGGAATTCA TGACTGGGCT GCGTCTCCTT CCTTCCTTC

39

10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

15

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

20

(iii) ANTISENSE: NEIN

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

GAGAGGCCCG GGAGCCTGG

19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

30

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 31 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTISENSE: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GCTGAATTCG AAGACATCCC CGACACCAAG G

31

10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 42 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

15

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

20

(iii) ANTISENSE: NEIN

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TGCTCTAGAA AGCTTAAGTT CACTGGTCGT CAGCGTCGAG GG

42

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 13:

30

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 43 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iii) ANTISENSE: NEIN

5

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

CCGGAATTCG ATATCCAAGC GCGGGATCGG GCCTGTGCTC GAC

43

10

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

15

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

20

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Aspergillus niger

25

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Ile Ser Lys Arg

1

30

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 7 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

35

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

- 50 -

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(v) ART DES FRAGMENTS: inneres

5 (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: *Saccharomyces cerevisiae*

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

10

Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

1

5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 16:

15

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 38 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

25

(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

30

ACTCGAGAAT TCACCATGAC TGGGCTGCGT CTTCTTCC

38

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

35

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

5

(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

10

ACTAGAGCGG CCGCCTATCA CTGGTCGTCA GCGTCGAGGG C 41

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 18:

15

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 39 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

20

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: JA

25

(iii) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

30

ACTCGAGAAT TCGGGATCGG GCCTGTGCTC GACCTCACG 39

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

35

(A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

5 (v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO. 19

10 Gly Ile Gly Pro Val Leu Asp Leu Thr Ile Ser Arg Ala Val  
1 5 10

15

20

25

30

35

## Patentansprüche

1. DNS-Sequenz, die für ein Protein mit Laccaseaktivität kodiert, dadurch gekennzeichnet, daß sie die DNS-Sequenz SEQ ID NO:1 ab Position 76 bis einschließlich Position 1572 oder SEQ ID NO:2 ab Position 76 bis einschließlich Position 1572 oder eine DNS-Sequenz mit einer Sequenzhomologie größer als 80 % zu den genannten DNS-Sequenzen umfasst.
2. Expressionsvektor, der eine DNS-Sequenz gemäß Anspruch 1 enthält.
3. Expressionsvektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich enthält: einen Promotor, der die Expression des Laccasegens in einem Wirtsorganismus vermittelt sowie für den Wirtsorganismus passende Signale für die Transkriptionstermination, die funktionell mit dem 3'-Ende der DNS-Sequenz gemäß Anspruch 1 verknüpft sind.
4. Expressionsvektor nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Promotor ausgewählt ist aus der Gruppe tac-Promotor, Subtilisin-Promotor, GAL-Promotor, TAKA-Amylase-Promotor, Polyhedrin-Promotor, Glucoamylase Promotor, GAPDH-Promotor und Alkoholoxidase-Promotor.
5. Expressionsvektor nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich eine N-terminale Signalsequenz enthält.
6. Expressionsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die N-terminale Signalsequenz die natürliche im Laccasegen enthaltene Signalsequenz ist oder ausgewählt ist aus der Gruppe der Signalsequenzen der folgenden sekretierten Proteine: alpha-Cyclodextrin-Glucosyltransferase aus *Klebsiella oxytoca*, Subtilisin aus *Bacillus subtilis*, alpha-Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae*, saure Phosphatase aus *Pichia pastoris*, alpha-Amylase aus *Aspergillus niger* oder Glucoamylase aus *Aspergillus niger* bzw. aus *Aspergillus awamori*.

7. Expressionsvektor nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet,  
daß ein Gen für ein sekretiertes Protein, bzw. ein Genab-  
schnitt für sekretiertes Fragment eines Proteins, funktionell  
5 mit dem Laccasegen verknüpft ist.

8. Mikroorganismenstamm, der eine DNS-Sequenz gemäß Anspruch 1  
oder einen Expressionsvektor gemäß einem der Ansprüche 2 bis 7  
enthält.

10

9. Protein umfassend die Proteinsequenz SEQ ID NO:3.

10. Verwendung des Proteins gemäß Anspruch 9 für die Deligni-  
fizierung von Zellstoff, die Depolymerisierung hochmolekularer  
15 Aggregate, das Delinking von Altpapier, die Polymerisierung  
aromatischer Verbindungen in Abwässern, vor allem von lignin-  
haltigen Abwässern aus der Zellstoffbleiche, die Oxidation von  
Farbstoffen, bzw. die Aktivierung von Farbstoffen zur Pigment-  
bildung, die Verwendung in der organischen Synthese bei Kopp-  
20 lungsreaktionen von aromatischen Verbindungen oder der Oxi-  
dation aromatischer Seitenketten.

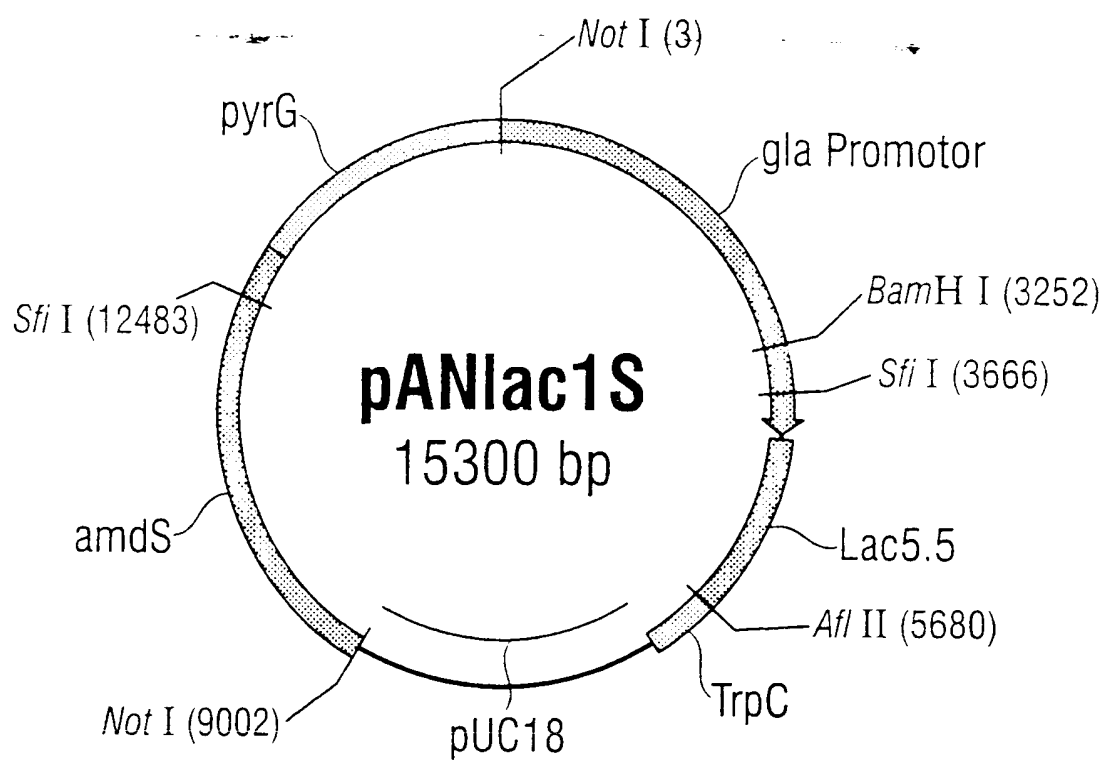
25

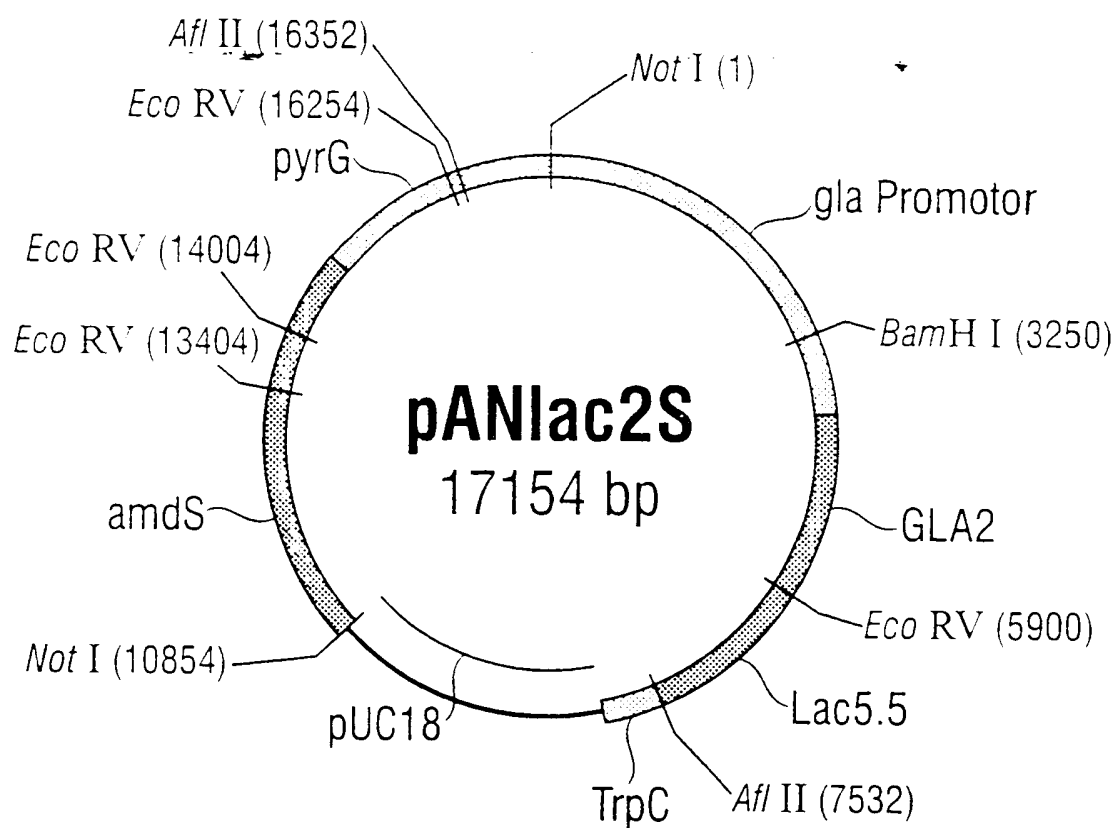
30

35

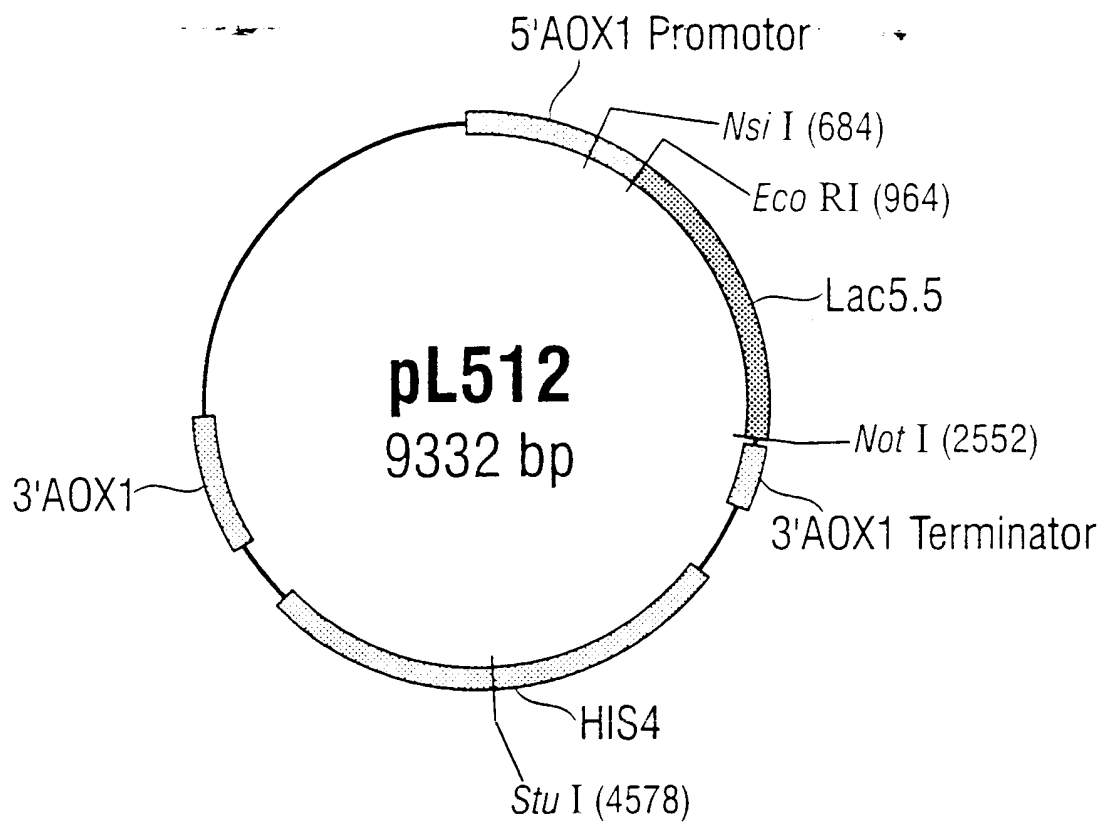


1 / 8

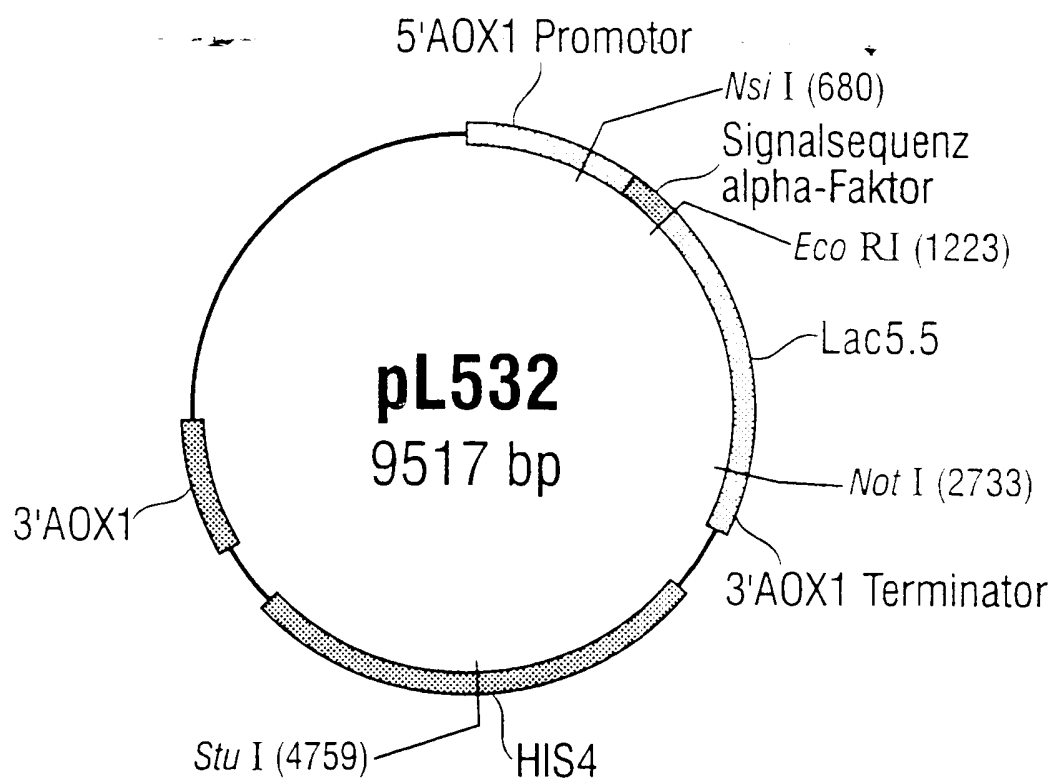
***Fig. 1***

***Fig. 2***

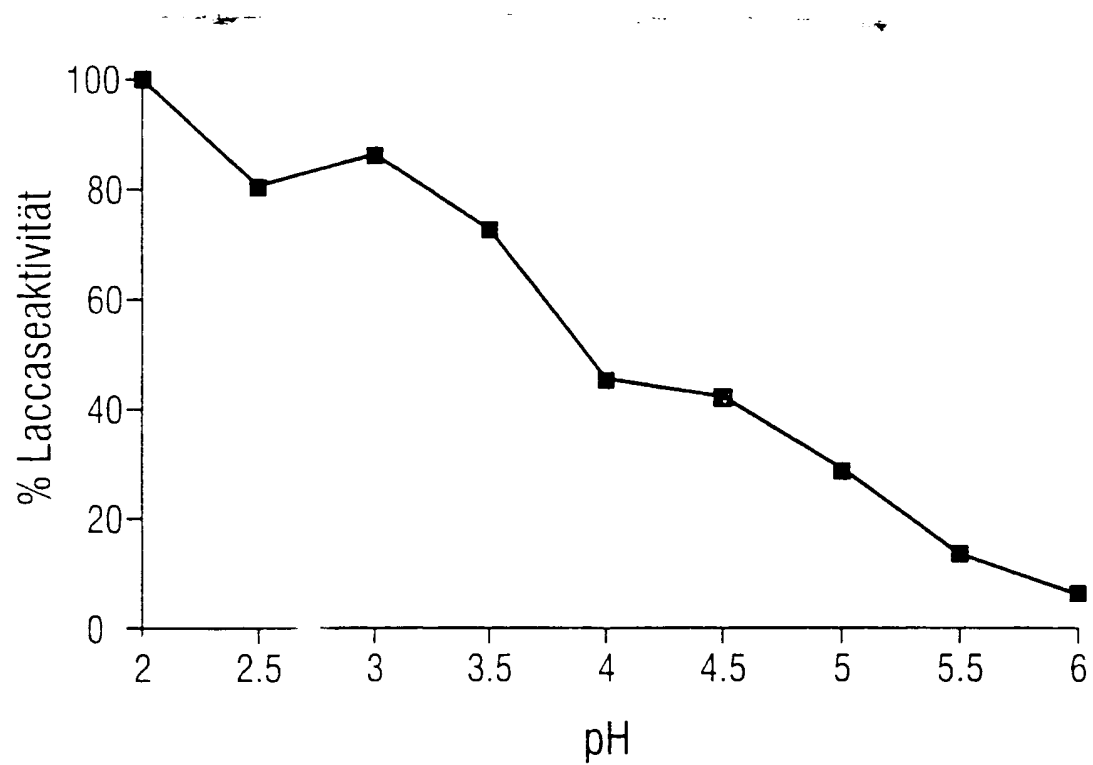
3 / 8

***Fig. 3***

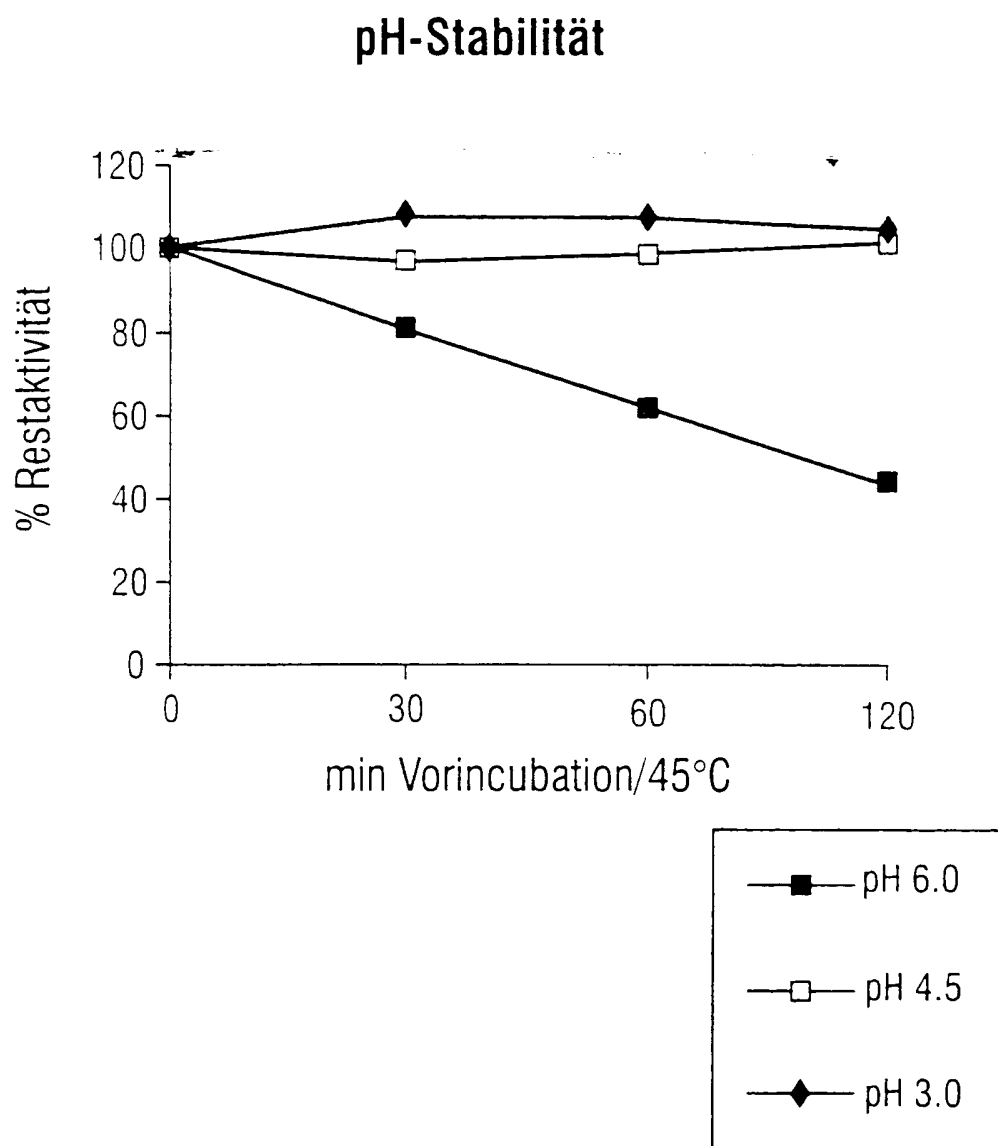
4 / 8

***Fig. 4***

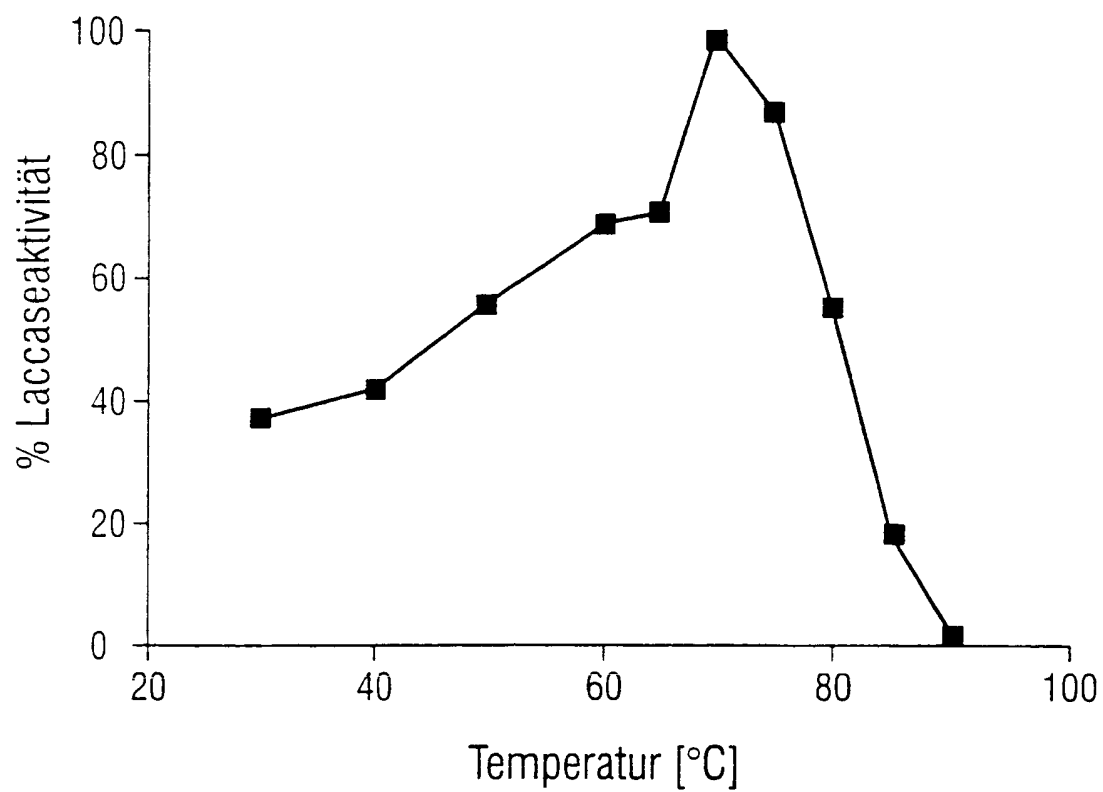
5 / 8

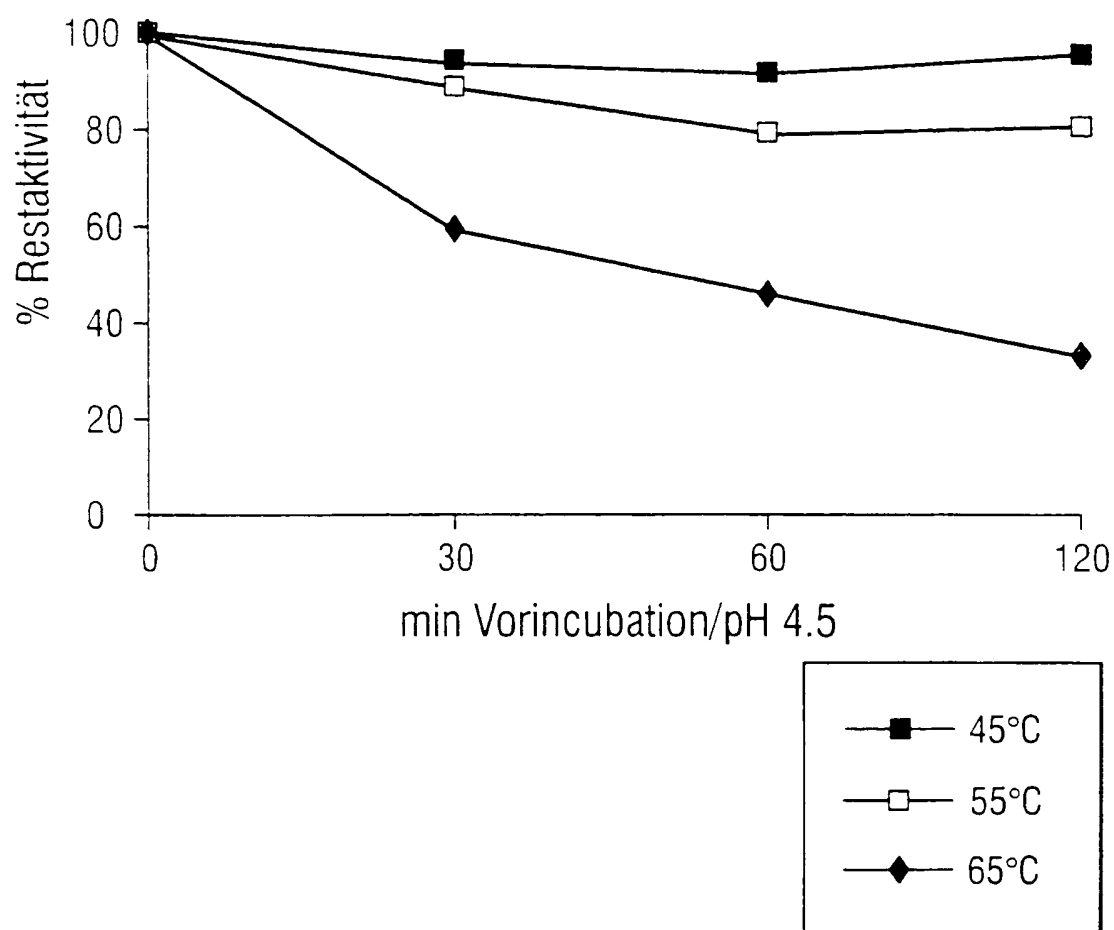
***Fig. 5*****pH-Optimum**

6 / 8

**Fig. 6**

7 / 8

***Fig. 7*****Temperaturoptimum**

***Fig. 8*****Temperaturstabilität**



**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C12N 15/53, 9/02, 1/15		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/55628
			(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Dezember 1998 (10.12.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT EP98 03343		(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, ID, JP, KR, NO, NZ, PL, RU, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 4. Juni 1998 (04.06.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 24 039.9 6. Juni 1997 (06.06.97) DE		Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht</i>	
(71) Anmelder <i>(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)</i> : CONSOR- TIUM FÜR ELEKTROCHEMISCHE INDUSTRIE GMBH [DE/DE]; Zielstattstrasse 20, D-81379 München (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 4. März 1999 (04.03.99)	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder <i>(nur für US)</i> : PFALLER, Rupert [DE/DE]; Nibelungenstrasse 6, D-80639 München (DE); WICH, Günter [DE/DE]; Uttingerstrasse 14, D-81379 München (DE).			
(74) Anwälte: POTTEN, Holger usw., Wacker-Chemie GmbH, Zentralbereich PML, Hanns-Seidel-Platz 4, D-81737 München (DE).			
(54) Title: DNA SEQUENCES, EXPRESSION OF SAID DNA SEQUENCES, THERMOPILE LACCASES CODED BY SAID DNA SEQUENCES AND THE USE THEREOF			
(54) Bezeichnung: DNS-SEQUENZEN, EXPRESSION DIESER DNS-SEQUENZEN, DURCH DIE DNS-SEQUENZEN KODIERTE THERMOPHILE LACCASEN SOWIE DEREN VERWENDUNG			
(57) Abstract			
<p>The invention relates to DNA sequences which code for proteins with laccase activity, comprising one of the DNA sequences (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2). The invention also relates to the expression of these DNA sequences, thermophile laccases coded by said DNA sequences and their use for delignifying cellulose, depolymerizing high-molecular aggregates, de-inking waste paper, polymerising aromatic compounds in waste liquids, especially waste liquids from cellulose bleaching, oxidising colorants and activating colorants to produce pigments, and their use in organic synthesis in coupling reactions of aromatic compounds or the oxidation of aromatic side chains.</p>			
(57) Zusammenfassung			
<p>Die Erfindung betrifft DNS-Sequenzen, die für Proteine mit Laccase-Aktivität kodieren und eine der DNS-Sequenzen (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2) umfassen. Die Erfindung betrifft ferner die Expression dieser DNS-Sequenzen, die durch die DNS-Sequenzen kodierte thermophilen Laccasen sowie deren Verwendung für die Delignifizierung von Zellstoff, die Depolymerisierung hochmolekularer Aggregate, das Deinking von Altpapier, die Polymerisierung aromatischer Verbindungen in Abwässern, vor allem von ligninhaltigen Abwässern aus der Zellstoffbleiche, die Oxidation von Farbstoffen, bzw. die Aktivierung von Farbstoffen zur Pigmentbildung, die Verwendung in der organischen Synthese bei Kopplungsreaktionen von aromatischen Verbindungen oder der Oxidation aromatischer Seitenketten.</p>			

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 98/03343

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/53 C12N9/02 C12N1/15

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEIF JÖNSSON ET AL.: "Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus <i>Trametes versicolor</i> and structural features of basidiomycete laccases" <i>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA</i> , vol. 1250, 1995, pages 210-215. XP002083886 see page 210, right-hand column, paragraph 3 - page 214, right-hand column, paragraph 2 ---	1-10
X	WO 96 00290 A (NOVO NORDISK A/S) 4 January 1996 see page 3, line 5 - line 30 see page 6, line 28 - page 18, line 2 --- -/-	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C

☒ Patent family members are listed in annex

### Special categories of cited documents

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 November 1998

Date of mailing of the international search report

27/11/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo.nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 96/03343

## C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>MARIANA MANSUR ET AL.: "Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading Basidiomycete CECT 20197" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 63, no. 7, July 1997, pages 2637-2646, XP002083887  see abstract  see page 2640, left-hand column, paragraph 3 - page 2643</p> <p>-----</p>	1-10

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 98/03343

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9600290 A	04-01-1996	US 5770418 A	23-06-1998
		AU 2827895 A	19-01-1996
		CA 2193070 A	04-01-1996
		CN 1157636 A	20-08-1997
		EP 0767836 A	16-04-1997
		FI 965201 A	21-02-1997
		JP 10502806 T	17-03-1998
		NZ 288901 A	27-04-1998
		US 5667531 A	16-09-1997

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03343

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/53 C12N9/02 C12N1/15

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfungs-Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole

IPK 6 C12N

Recherchierte über nicht zum Mindestprüfungs-gereichende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank, Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile Blatt, Anspruch Nr.

X	LEIF JÖNSSON ET AL.: "Characterization of a laccase gene from the white-rot fungus <i>Trametes versicolor</i> and structural features of basidiomycete laccases" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, Bd. 1250, 1995, Seiten 210-215, XP002083886 siehe Seite 210, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 214, rechte Spalte, Absatz 2 ---	1-10
X	WO 96 00290 A (NOVO NORDISK A/S) 4. Januar 1996 siehe Seite 3, Zeile 5 - Zeile 30 siehe Seite 6, Zeile 23 - Seite 13, Zeile 2 ---	1-10



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. November 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

27/11/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P. B. 5816 Patentaan 2  
NL-2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tr. 31 651 epo.nl  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Montero Lopez, B

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

I. Nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/03343

C (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
P.X	<p>MARIANA MANSUR ET AL.: "Identification of a laccase gene family in the new lignin-degrading Basidiomycete CECT 20197" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Bd. 63, Nr. 7, Juli 1997, Seiten 2637-2646, XP002083887  siehe Zusammenfassung  siehe Seite 2640, linke Spalte, Absatz 3 - Seite 2643</p> <p>-----</p>	1-10

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Referenzzeichen

PCT/EP 96/03343

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglieder der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9600290 A	04-01-1996	US 5770418 A	23-06-1998
		AU 2827895 A	19-01-1996
		CA 2193070 A	04-01-1996
		CN 1157636 A	20-08-1997
		EP 0767836 A	16-04-1997
		FI 965201 A	21-02-1997
		JP 10502806 T	17-03-1998
		NZ 288901 A	27-04-1998
		US 5667531 A	16-09-1997
-----			